

*Bogdan Kędzia Elżbieta Hołderna-Kędzia

Immunostymulujące działanie propolisu

Immunostimulatory activity of propolis

Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich

Dyrektor Instytutu: dr hab. inż. Małgorzata Zimmiewska, prof. IWNiRZ

SUMMARY

Research on experimental animals conducted for nearly 30 years clearly prove that the ethanol and water extracts of propolis provided parenterally have an immunostimulatory effect. In addition, it was revealed that in case of experimental animals immunized with specific antigens, the influence of propolis extracts and their components increased the agglutination titre, phagocytosis and antibody production compared to the antigens themselves. Contemporary research on immunostimulatory properties of propolis extracts clearly indicate the activation of macrophages and the increase of antimicroorganisms immunity, as well as stimulation of the antibody production under the influence of ethanol and water extracts from propolis and their components (immunoadjuvants). The most important immunostimulatory components of propolis include caffeic acid, dicaffeoylquinic acids and caffeic phenylethyl ester (CAPE). The research presented in this study creates the possibility of applying propolis extracts and their components in practice for the production of immune serum on an industrial scale.

Keywords: propolis extracts, immunostimulatory activity, experimental animals, CAPE, immunoadjuvants

STRESZCZENIE

Badania na zwierzętach doświadczalnych prowadzone od blisko 30 lat wskazują jednoznacznie, że etanolowe i wodne ekstrakty z propolisu podawane pozajelitowo odznaczają się działaniem immunostymulującym. Ponadto wykazano, że u zwierząt doświadczalnych uodparnianych za pomocą swoistych antygenów ekstrakty propolisowe oraz ich składniki podwyższały miano aglutynacji, fagocytozę oraz wytwarzanie przeciwciał w porównaniu do samych antygenów. Współczesne badania nad immunostymulującymi właściwościami ekstraktów propolisowych wyraźnie wskazują na aktywację makrofagów i wzrost odporności przeciwdrobnoustrojowej oraz stymulowanie wytwarzania przeciwciał (immunoglobulin) pod wpływem ekstraktów etanolowych i wodnych z propolisu oraz ich składników. Do najważniejszych immunostymulujących składników propolisu zalicza się kwas kawowy, kwasy dikawoilochinowe oraz ester fenyletylowy kwasu kawowego (CAPE). Przedstawione w opracowaniu badania stwarzają możliwości wykorzystania ekstraktów z propolisu i ich składników w praktyce do wytwarzania surowic odpornościowych na skalę przemysłową.

Słowa kluczowe: ekstrakty propolisowe, działanie immunostymulujące, zwierzęta doświadczalne, CAPE, immunoadjuwanty

Początkowy okres badań

Jako okres początkowy przyjęto umownie badania prowadzone w latach 1970-1990. Kiwalkina (1) stwierdziła, że miano aglutynacji, fagocytoza i wytwarzanie przeciwciał u świnek morskich uodparnianych za pomocą pełnego antygeny otrzymanego z *Salmonella enteritidis* w obecności propolisu podawanego drogą pozajelitową było znacznie wyższe niż w przypadku samego antygeny.

Szewczenko i wsp. (2) zaobserwowali, że 5% ekstrakt etanolowy z propolisu całkowicie hamował rozwój wirusa grypy u myszy, jeśli podawano go w postaci aerozolu do nosa lub górnych dróg oddechowych na 2 godziny przed zakażeniem tym wirusem. Ekstrakt

nie wykazywał działania, jeśli podawano go myszom już zakażonym wirusem grypy.

Teterew (3) odnotował, że dodatek propolisu do szczepionki paradurowej wzmacniał tworzenie się aglutyniny w surowicy krwi cieląt. Po 120 dniach od podania szczepionki i propolisu poziom O- i N-aglutynin w surowicy krwi zwierząt był znacznie wyższy niż po podaniu samej szczepionki.

Aleksandrowicz i Daniłow (4) wykazali, że ekstrakt etanolowy z propolisu podawany pozajelitowo myszom powodował stymulację makrofagów, co objawiało się znacznie szybszym eliminowaniem gronkowców złocistych (*Staphylococcus aureus*) z ich organizmu w porównaniu z myszami kontrolnymi.

Budrakowa (5) stwierdziła, że podawanie ekstraktu etanolowego z propolisu w ilości 5 mg oraz 20 j. toksyny tężcowej hiperimmunizowanym królikom 1 raz w tygodniu przez okres 63 dni spowodowało podwyższenie wytwarzania anatoksyny tężcowej u zwierząt w granicach od 20 do 240 j.

W innym doświadczeniu Budrakowa (6) dowiodła, że podanie 60 j. toksyny tężcowej hiperimmunizowanym królikom wraz z 5 mg ekstraktu etanolowego z propolisu już po 7 dniach spowodowało znaczny wzrost plazmocyty w węzłach chłonnych. Poziom plazmocyty w węzłach był wielokrotnie wyższy w porównaniu do zwierząt nieotrzymujących tego ekstraktu. Poza tym zaobserwowała ona, że średnia liczba plazmocyty w węzłach chłonnych blisko miejsca podania toksyny wynosiła początkowo 11 komórek, a po 4, 7 i 35 dniach doświadczenia ich liczba kształtowała się u zwierząt kontrolnych na poziomie średnio 16, 28 i 13 komórek. Natomiast u zwierząt otrzymujących toksynę tężcową wraz z ekstraktem propolisowym liczba plazmocyty w węzłach chłonnych wynosiła odpowiednio 21, 66 i 17 komórek w polu widzenia preparatu mikroskopowego.

Crisan i wsp. (7) badali wpływ ekstraktu wodnego z propolisu na wchłanianie oczyszczonego antygeny powierzchniowego zapalenia wątroby HBsAg. Stwierdzono znaczne zwolnienie wchłaniania badanego antygeny pod wpływem ekstraktu propolisowego, co spowodowało wyraźne przedłużenie jego działania i lepsze uodpornienie zwierząt doświadczalnych na zakażenie wirusem zapalenia wątroby. A zatem ekstrakt wodny z propolisu okazał się adjuwantem, tzn. substancją, która wzmacnia immunogenność antygeny.

Według Esanu i wsp. (8) podawanie wodnego ekstraktu z propolisu donosowo myszom po zakażeniu ich wirusem grypy obniżało o około 45% poziom hemaglutynin w płucach i stopień śmiertelności zwierząt.

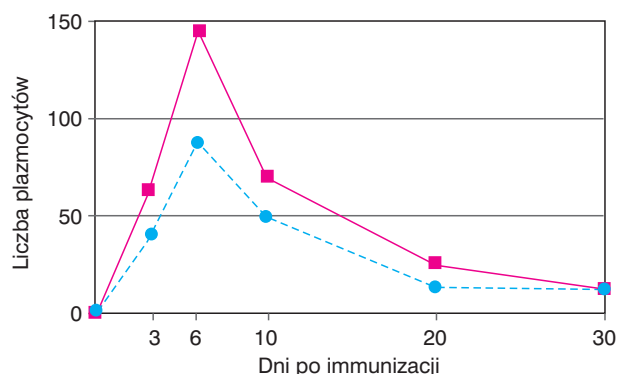
Badania Olinescu i wsp. (9) wykazały, że ekstrakt etanolowy z propolisu dodany do surowicy krwi ludzkiej zwiększał liczbę wolnych grup SH oraz powodował wzrost aktywności ceruloplazminy – glikoproteiny charakteryzującej się wyraźnymi właściwościami przeciwutleniającymi.

Podobnie Król i wsp. (10) zauważyli, że ekstrakt etanolowy z propolisu działa przeciwutleniająco w odniesieniu do neutrofilów ludzkich i zwiększa fagocytozę obsonizowanego zymosanu przez te komórki żerne organizmu. Świadczy to o immunostymulujących właściwościach ekstraktów propolisowych.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Kiwalkinę i wsp. (11) wskazują, że ekstrakt etanolowy z propolisu podany szczurom wraz z kompleksem glicydotyminowym wyizolowanym z pałeczek *Salmonella enteritidis*

warunkował znacznie intensywniejszą reakcję plazmocytyarną i stymulował powstawanie przeciwciał w węzłach chłonnych, zarówno regionalnych, jak i oddalonych od miejsca podania antygeny. Antygen podawano jednorazowo i obserwacje prowadzono przez 90 dni. Okazało się, że po podaniu antygeny z propolisem już po 3 dniach obserwowano narastanie liczby plazmocyty i po 6 dniach ich liczba wynosiła 146 w polu widzenia preparatu mikroskopowego w porównaniu do 91 plazmocyty obecnych w węzłach chłonnych po podaniu samego antygeny (ryc. 1). Przeciwciała u szczurów immunizowanych antygenem z dodatkiem propolisu zaczęły pojawiać się w surowicy tych zwierząt już po 3 dniach. Ich maksymalne miano stwierdzono po 27 dniach i wynosiło ono 1:10 400. Natomiast w grupie kontrolnej zwierząt maksymalne miano przeciwciał odnotowano dopiero po 44 dniach i wynosiło ono 1:3460. Ponadto stwierdzono, że po podaniu antygeny z propolisem proliferacja (namnażanie) plazmocyty w regionalnych węzłach chłonnych była 3,7-6 razy bardziej intensywna niż po immunizacji samym antygenem. Miano aglutynin w surowicy krwi po podaniu antygeny z propolisem było także 3,7-4 razy wyższe w porównaniu do samego antygeny.

W późniejszej pracy Kiwalkina i wsp. (12) badali wpływ uodporniania za pomocą szczepionki z wirusa choroby Aujeszkiego (występującej u wszystkich gatunków zwierząt domowych i hodowlanych) z dodatkiem propolisu na oddziaływanie układu immunologicznego u białych szczurów i świń. Wyniki badań oceniano na podstawie aktywności unieczynniania wirusa, komplementarnej aktywności surowicy krwi, reakcji plazmocytyarnej i przebiegu procesu zakażenia. U szczurów stwierdzono unieczynnianie wirusów pod wpływem przeciwciał po 3 dniach. Maksymalne wytwarzanie przeciwciał stwierdzono po 7 dniach od

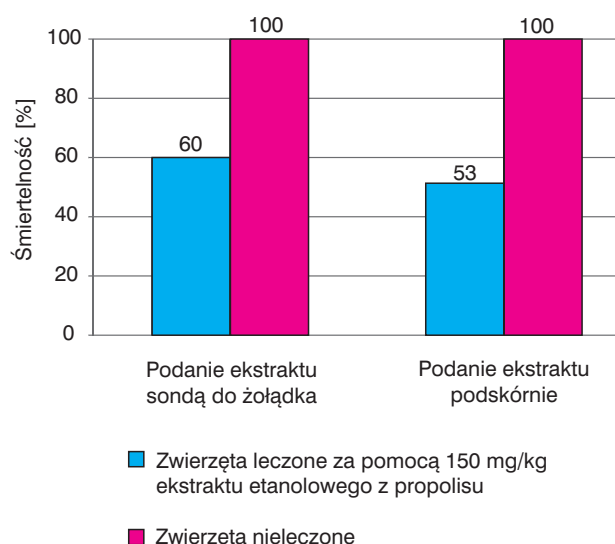


Ryc. 1. Wpływ immunizacji szczurów antygenem otrzymanym z *Salmonella enteritidis* i propolisem na liczbę plazmocyty w węzłach chłonnych (wg 11). Linia ciągła – antygen + propolis, linia przerywana – sam antygen

podania szczepionki. Miano przeciwciał w surowicy krwi zwierząt, którym podano szczepionkę i propolis, było wyższe od 5 do 8 razy w porównaniu do zwierząt kontrolnych, które otrzymały samą szczepionkę. Reakcja plazmocytna u szczurów uodpornianych w obecności propolisu była wcześniejsza i bardziej wyraźna, a także utrzymywała się dłużej w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Z kolei u świń uodpornianych z udziałem propolisu obserwowano 4-5-krotnie silniejsze unieczynnianie wirusów niż w przypadku zwierząt kontrolnych. Reakcja plazmocytna i aktywność komplementarna surowicy krwi były wyższe po podaniu szczepionki i propolisu i trwały przez cały okres prowadzonych doświadczeń.

Na podstawie powyższych badań można stwierdzić, że propolis jest silnym adjuwantem i podawanie go wraz z antygenami prowadzi do znacznej stymulacji układu odpornościowego.

Na zakończenie tej części opracowania należy również wspomnieć o badaniach Neycheva i wsp. (13) dotyczących immunostymulującego działania ekstraktu wodnego z propolisu po doświadczalnym zakażeniu myszy wirusem grypy. W tym kontekście autorzy publikacji nakreślili mechanizmy działania układu odpornościowego w zakresie fagocytozy, poziomu komplementarnego surowicy krwi i powstawania komórek gwiaździstych. Na rycinie 2 przedstawiono przeżywalność myszy po 5 dniach od momentu ich donosowego zakażenia wirusem grypy. Stwierdzono, że po leczeniu zwierząt za pomocą ekstraktu wodnego z propolisu w ilości 150 mg/kg ich przeżywalność znacznie wzrosła. Zwierzęta leczone ekstraktem drogą



Ryc. 2. Przeżywalność myszy po 5 dniach od momentu zakażenia ich donosowo wirusem grypy (wg 12)

pokarmową przeżywały o 40% częściej, a leczone drogą iniekcijną o 57% częściej.

Rycina 3 przedstawia natomiast wpływ ekstraktu wodnego z propolisu na zdolność fagocytozy przez makrofagi komórek bakteryjnych *Yersinia pseudotuberculosis*. Badania prowadzone *in vitro* wykazały, że makrofagi stymulowane ekstraktem propolisowym w stężeniu 100 µg/ml pochłaniały ponad dwukrotnie więcej wymienionych bakterii w porównaniu do makrofagów niestymulowanych. Ponadto ekstrakt propolisowy podwyższał komplementarność surowicy krwi, indeks śledzionowy oraz indeks odpornościowych komórek gwiaździstych w porównaniu do zwierząt nieleczonych.

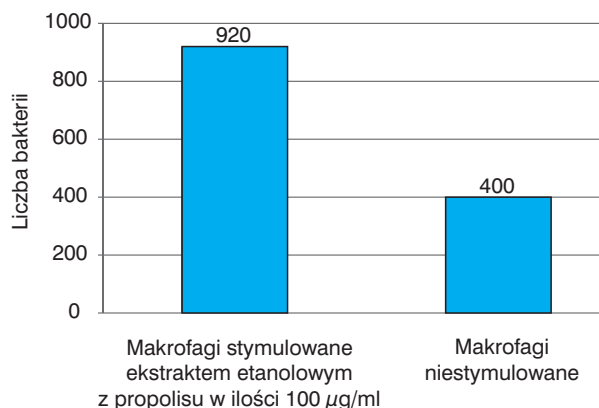
Powyższe badania potwierdzają immunostymulującą aktywność ekstraktów propolisowych, stwarzającą możliwość praktycznego wykorzystania tego produktu w terapii.

Współczesny etap badań

Można przyjąć, że współczesne badania nad immunostymulującymi właściwościami ekstraktów propolisowych zapoczątkowane zostały w latach 90. Koncentrowały się one głównie na zagadnieniach aktywacji makrofagów i wzrostu ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz stymulowaniu wytwarzania przeciwciał (immunoglobulin) pod wpływem ekstraktów otrzymanych z propolisu i ich składników.

Stymulowanie makrofagów przez ekstrakty propolisowe i ich składniki

Dimov i wsp. (14) stwierdzili, że myszy zakażone dootrzewnowo drobnoustrojami chorobotwórczymi i leczone następnie za pomocą ekstraktu wodnego z propolisu na drodze codziennego dootrzewnowego podawania tego ekstraktu w ilości 150 mg/kg m.c.



Ryc. 3. Liczba bakterii *Yersinia pseudotuberculosis* pochłonięta przez makrofagi w teście *in vitro* (wg 12)

zwierząt przez 30 dni, przeżywały dłużej w porównaniu do myszy kontrolnych (nieleczonych). Z tabeli 1 wynika, że myszy zakażone gronkowcem złocistym (*Staphylococcus aureus*) i leczone ekstraktem propolisowym przeżywały średnio 1,2 dnia dłużej, myszy zakażone pałeczką zapalenia płuc (*Klebsiella pneumoniae*) – średnio 2,2 dnia dłużej, a zakażone grzybami drożdżoidalnymi (*Candida albicans*) – średnio 17,0 dnia dłużej w porównaniu do zwierząt nieleczonych.

Autorzy tłumaczą ten fakt większą aktywnością makrofagów, czego wyznacznikiem jest wytwarzanie przez nie pod wpływem ekstraktu wodnego z propolisu większej ilości interleukiny IL-1 (tab. 2). Wykazano, że podawanie ekstraktu propolisowego w ilości 50 mg/kg przez 3 kolejne dni spowodowało zwiększenie wytwarzania przez makrofagi otrzewnowe

interleukiny IL-1 po 5 dniach o 3%, po 7 dniach o 14%, po 15 dniach o 17% i po 20 dniach o 40,3% w porównaniu do wartości wyjściowych.

Na tej podstawie możemy przypuszczać, że dłuższe przeżywanie zwierząt zakażonych drobnoustrojami chorobotwórczymi i leczonymi ekstraktem propolisowym jest wynikiem pobudzania przez IL-1 makrofagów otrzewnowych do uwalniania neutrofilii, do wytwarzania przeciwciał przez limfocyty B oraz pobudzania limfocytów T do wytwarzania interferonu γ (INF- γ), czynnika niszczącego komórki drobnoustrojów.

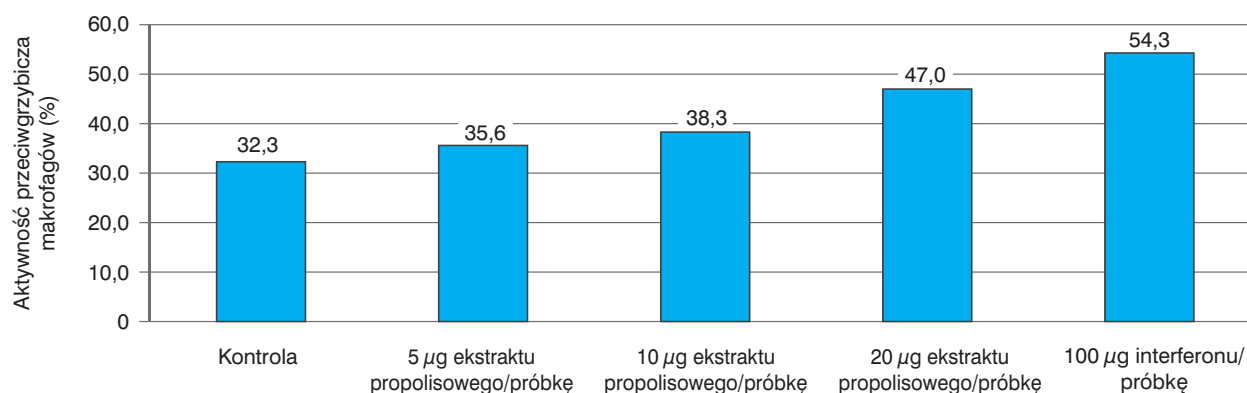
Murad i wsp. (15) badali wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na aktywność przeciwgrzybiczą makrofagów otrzewnowych myszy wobec drożdżaka chorobotwórczego *Coccidioides brasiliensis*. Wyniki badań przedstawione na rycinie 4 wskazują, że dodatek

Tab. 1. Wpływ ekstraktu wodnego z propolisu na przeżywalność myszy zakażonych drobnoustrojami chorobotwórczymi (wg 14)

Drobnoustroje użyte do zakażenia zwierząt	Dawka ekstraktu i droga podania	Średni czas przeżycia myszy w porównaniu do kontroli (dni)
<i>Staphylococcus aureus</i>	150 mg, dootrzewnowo	1,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	150 mg, dootrzewnowo	2,2
<i>Candida albicans</i>	150 mg, dootrzewnowo	17,0

Tab. 2. Wpływ ekstraktu wodnego z propolisu na wytwarzanie przez makrofagi otrzewnowe interleukiny IL-1 w badaniach *in vitro* (wg 14)

Czas pobierania makrofagów od myszy po podaniu ekstraktu w ilości 50 mg/kg m.c. przez 3 kolejne dni	Ilość wytwarzanej IL-1 w porównaniu do kontroli (jedn.)
5	1,03
7	1,14
15	1,17
20	4,03



Ryc. 4. Wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na aktywność przeciwgrzybiczą makrofagów otrzewnowych myszy wobec *Paracoccidioides brasiliensis* (wg 15)

ekstraktu propolisowego do hodowli makrofagów mysich wzmagając ich aktywność przeciwgrzybiczą wyrażoną stosunkiem liczby komórek badanych grzybów unieczynnionych przez ekstrakt propolisowy w porównaniu do kontroli. Przy stężeniu 5 µg ekstraktu/próbkę aktywność przeciwgrzybicza makrofagów wzrosła o 10,2%, przy stężeniu 10 µg/próbkę o 18,6%, a przy stężeniu 20 µg ekstraktu/próbkę wzrosła ona o 45,5% w stosunku do samych makrofagów. Interferon γ w tych warunkach w stężeniu 100 µg/próbkę wzmagając aktywność przeciwgrzybiczą makrofagów mysich o 68,1%. Przedstawione wyniki wyraźnie wskazują na stymulowanie przez ekstrakt propolisowy aktywności przeciwgrzybiczej makrofagów mysich w warunkach *in vitro*.

Orsi i wsp. (16) określili wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na bakteriobójcze działanie makrofagów otrzewnowych myszy wobec pałeczek *Salmonella typhimurium* oraz wpływ tego ekstraktu na wytwarzanie przez makrofagi w tych warunkach nadtlenu wodoru i tlenu azotu. Wyniki badań przedstawione w tabeli 3 pokazują, że makrofagi po zmieszaniu z pałeczkami mysiego duru brzuszego *S. typhimurium* w stosunku 1:10 pod wpływem różnych stężeń ekstraktu propolisowego (3, 10, 30 i 100 µg/ml) są w stanie zniszczyć o około 28% więcej tych drobnoustrojów niż bez ekstraktu. Interferon γ w stężeniu 100 µg/ml za-

bijał w tych warunkach ponad 100% więcej badanych pałeczek chorobotwórczych.

Wykazano ponadto, że pod wpływem różnych stężeń ekstraktu propolisowego makrofagi wytwarzają ponad trzykrotnie więcej nadtlenu wodoru, natomiast wytwarzanie tlenu azotu pozostaje praktycznie na tym samym poziomie co w kontroli. Dla porównania makrofagi pod wpływem 100 µg/ml interferonu γ wytwarzają tylko około 71% więcej nadtlenu wodoru i około 23% więcej tlenu azotu (tab. 3). Na tej podstawie można przyjąć, że wzrost działania bakteriobójczego makrofagów pod wpływem ekstraktów propolisowych jest związany ze wzrostem wytwarzania przez te komórki żerne nadtlenu wodoru.

Z badań Syamsudina i wsp. (17) wynika, że 10% ekstrakt etanolowy z propolisu powodował wzrost liczby makrofagów i sfagocytowanych sporozoitów malarii *Plasmodium berghei* w zakażonym tym pasożytem organizmie myszy. Wyniki zamieszczone w tabeli 4 wskazują, że w porównaniu do kontroli, liczba makrofagów i sfagocytowanych sporozoitów *P. berghei* ulegała zwiększeniu wraz ze wzrostem stężenia podawanego myszom ekstraktu propolisowego. I tak po podaniu ekstraktu propolisowego w ilości 25 mg/kg m.c. myszy liczba makrofagów wzrosła o 20,7%, po podaniu 50 mg/kg m.c. o 57,3% i po podaniu 100 mg/kg m.c. myszy liczba makrofagów

Tab. 3. Wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na bakteriobójcze działanie makrofagów otrzewnowych myszy wobec *Salmonella typhimurium* oraz na wytwarzanie przez makrofagi nadtlenu wodoru i tlenu azotu (wg 16)

Stężenie ekstraktu propolisowego dodawanego do hodowli makrofagów	Aktywność bakteriobójcza (%)*	Wytwarzanie H ₂ O ₂ (µmol/20 tys. makrofagów)*	Wytwarzanie NO (µmol/20 tys. makrofagów)*
Kontrola	17,4	0,07	26,9
Ekstrakt (3 µg/ml)	22,6	0,16	30,1
Ekstrakt (10 µg/ml)	22,3	0,15	27,6
Ekstrakt (30 µg/ml)	21,6	0,18	26,4
Ekstrakt (100 µg/ml)	22,9	0,35	24,5
Interferon γ (100 µg/ml)	36,0	0,12	33,1

*Stosunek makrofagów do komórek *S. typhimurium* wynosił 1:10

Tab. 4. Wpływ 10% ekstraktu etanolowego z propolisu na wzrost liczby makrofagów i sfagocytowanych sporozoitów *Plasmodium berghei* w organizmie myszy (wg 17)

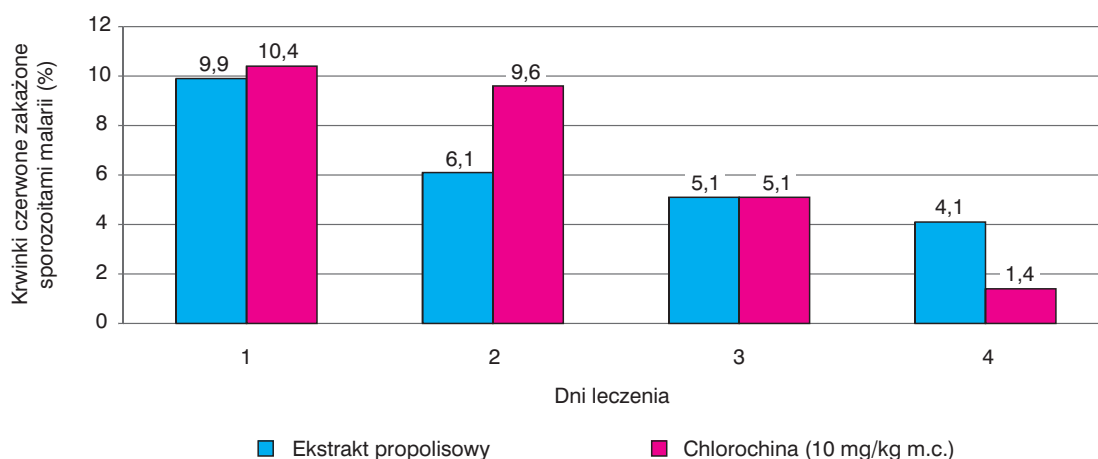
Stężenie 10% ekstraktu etanolowego z propolisu	Liczba makrofagów (10 ⁶ /ml surowicy krwi)	Liczba sfagocytowanych sporozoitów (%)
Kontrola	25,1	100,0
Ekstrakt (25 mg/kg m.c.)	30,3	143,3
Ekstrakt (50 mg/kg m.c.)	39,5	304,3
Ekstrakt (100 mg/kg m.c.)	45,1	381,2

wzrosła o 79,7% w porównaniu do kontroli. Z kolei liczba sfagocytowanych sporozoitów pasożyta ulegała zwiększeniu pod wpływem wzrastających dawek propolisu odpowiednio o 1,4; 3,0 i 3,8 raza w porównaniu do kontroli (bez propolisu).

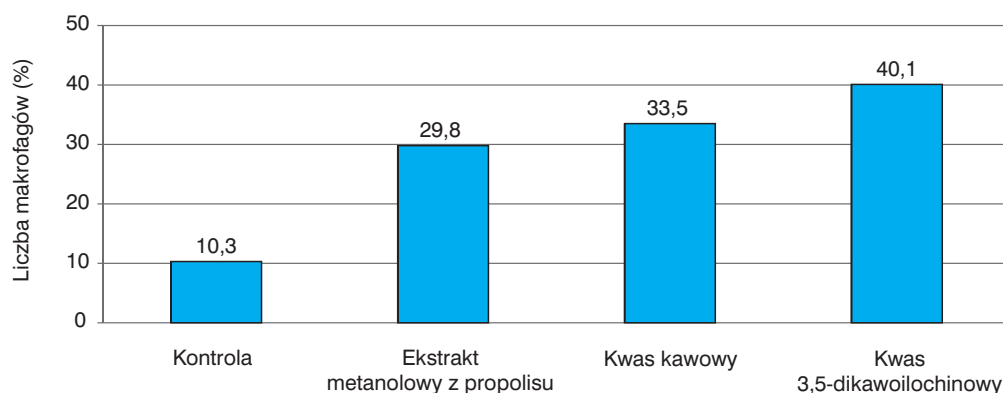
Interesujące są także wyniki leczenia myszy zakażonych sporozoitami malarii za pomocą ekstraktu etanolowego z propolisu (ryc. 5). Okazało się, że w pierwszych 2 dniach leczenia ekstrakt propolisowy w dawce 100 mg/kg m.c. myszy okazał się bardziej skuteczny w porównaniu do chlorochiny (w dawce 10 mg/kg m.c. myszy) – leku stosowanego do leczenia tej choroby w praktyce. Także w trakcie dalszego leczenia ekstrakt propolisowy systematycznie obniżał procent krwinek czerwonych zakażonych sporozoitami malarii.

Powyższe badania świadczą o wysokiej aktywności immunostymulującej propolisu w odniesieniu do organizmu myszy zakażonego malarią, opartej w dużym stopniu na fagocytujących właściwościach makrofagów.

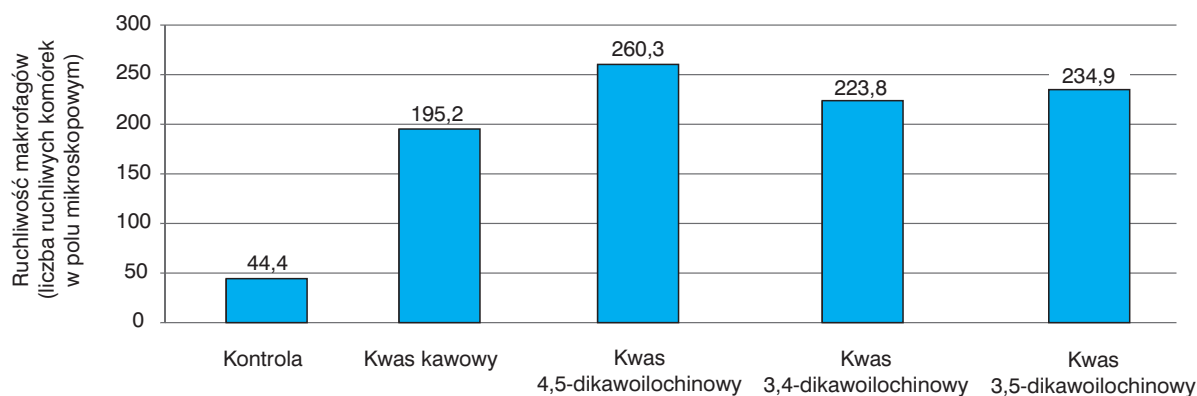
Przeprowadzone przez Tatefuji i wsp. (18) badania nad ekstraktem metanolowym z propolisu i wyizolowanymi z niego składnikami wskazują, że pobudzają one zarówno namnażanie makrofagów mysich, jak i ich ruchliwość. Wyniki badań zilustrowane na rycinie 6 pokazują, że ekstrakt metanolowy z propolisu wzmacniał namnażanie makrofagów 2,9 raza, kwas kawowy – 3,3 raza, a kwas 3,5-dikawoilochinowy – 3,9 raza w porównaniu do kontroli. Pozostałe wyizolowane kwasy kawoilochinowe powodowały namnażanie makrofagów w granicach 2,7-3,3 raza w porównaniu do kontroli. Natomiast ruchliwość makrofagów najbardziej była pobudzana przez kwas 4,5-dikawoilochinowy. Kwas kawowy i pozostałe kwasy kawoilochinowe pobudzały makrofagi do ruchu w nieco mniejszym stopniu (ryc. 7). Niemniej wszystkie wyizolowane substancje wzmacniały ruchliwość makrofagów mysich w granicach od 2,1 do 5,9 raza w porównaniu do kontroli (bez propolisu).



Ryc. 5. Leczenie myszy zakażonych sporozoitami malarii za pomocą 10% ekstraktu etanolowego z propolisu w dawce 100 mg/kg m.c. dziennie (wg 17)



Ryc. 6. Wpływ ekstraktu metanolowego z propolisu i wyizolowanych z niego składników na namnażanie się makrofagów (wg 18)



Ryc. 7. Wpływ składników wyizolowanych z ekstraktu metanolowego z propolisu na ruchliwość makrofagów (wg 18)

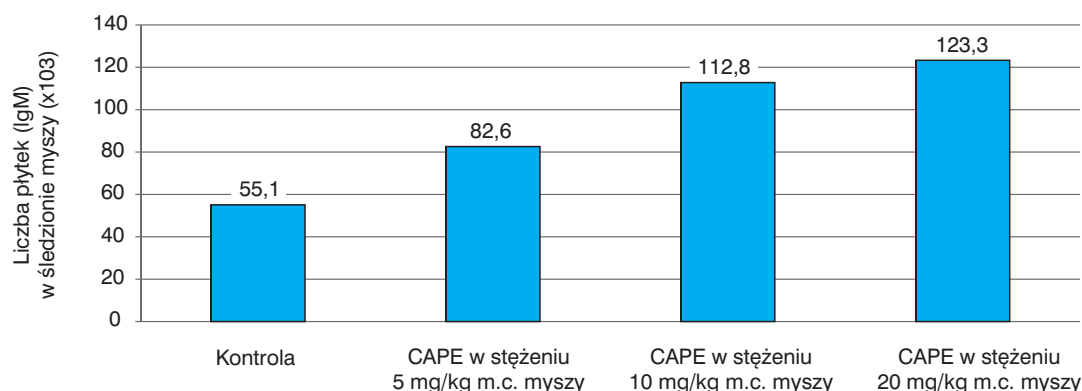
W podsumowaniu przytoczonych powyżej badań można z całą pewnością stwierdzić, że ekstrakty propolisowe wyraźnie pobudzają makrofagi zwierzęce, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, do większej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Dowodem na to są wysoka aktywność fagocytarna, wytwarzanie dużych ilości nadtlenu wodoru oraz zwiększone namnażanie i wzmożona ruchliwość makrofagów w porównaniu do badań kontrolnych bez udziału ekstraktów propolisowych.

Stymulowanie wytwarzania przeciwciał (immunoglobulin) pod wpływem ekstraktów propolisowych i ich składników

Na początek warto przytoczyć patent Markoniusa (19) oparty na wytwarzaniu przeciwciał antywirusowych z udziałem składników propolisu jako immunoadjuwantu. Autor połączył wyizolowane z propolisu składniki, takie jak pinocembrynę, 3-octan pinobanksyny oraz naryngeninę i podawał

je myszom w ilości 1 µg wraz z niekompletnym adjuwantem Freund'a (mieszanka oleju mineralnego i substancji emulgującej) i antygenem (unieczynnione wirusy) w ilości 5 µg na dawkę. Myszy immunizowano powyższą mieszaniną dwukrotnie w ciągu 4 tygodni. Po 7 tygodniach doświadczenia pobierano od zwierząt krew i w surowicy oznaczano miano powstałych przeciwciał. W surowicy zwierząt immunizowanych antygenem w obecności składników propolisowych jako immunoadjuwantu miano wynosiło 1:102 400, podczas gdy u zwierząt immunizowanych samym antygenem – tylko 1:6400.

Park i wsp. (20) badali wpływ estru fenyloetylowego kwasu kawowego (CAPE), składnika propolisu, na tworzenie się przeciwciał w śledzionie i krwi myszy na skutek działania antygenów. W pierwszym przypadku były to krwinki czerwone barana (ryc. 8). Stwierdzono, że CAPE wzmacniał wytwarzanie przeciwciał IgM w postaci płytek śledzionowych. Przy stężeniu 5 mg/kg m.c. odnotowano wzrost przeciwciał o ok. 50%, przy stężeniu 10 mg/kg o ok. 105%, a przy stężeniu CAPE 20 mg/kg m.c. myszy poziom przeciwciał IgM



Ryc. 8. Wpływ estru fenyloetylowego kwasu kawowego (CAPE) na tworzenie się przeciwciał IgM w postaci płytek w śledzionie myszy w obecności krwinek czerwonych barana jako antygeny (wg 20)

w śledzienie myszy wzrósł o ok. 138% w porównaniu do samego antygeny.

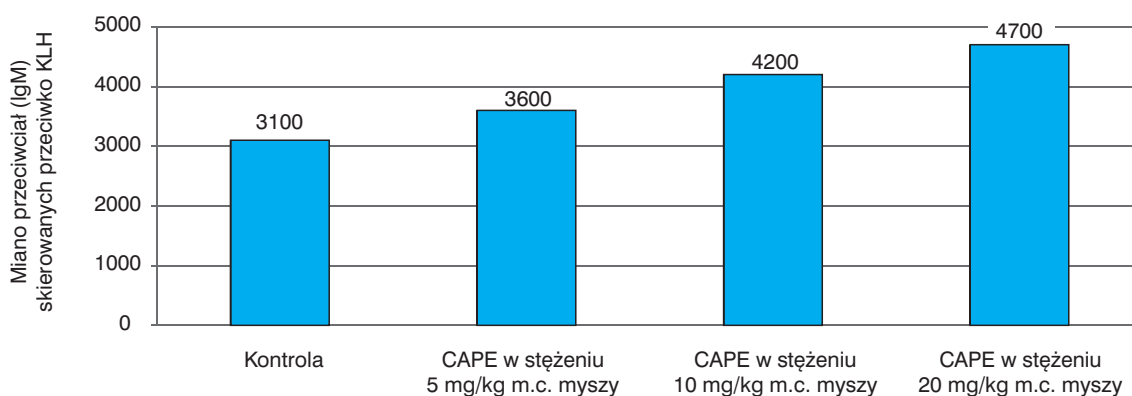
W drugim przypadku zastosowano jako antygen hemocjaniny porostu skalnego (KLH) (ryc. 9). W obecności CAPE miano przeciwciał IgM w surowicy krwi dość znacznie wzrosło w porównaniu do kontroli. I tak przy stężeniu 5 mg/kg m.c. wzrosło ono o ok. 16%, przy stężeniu 10 mg/kg m.c. o ok. 35%, natomiast przy stężeniu 20 mg/kg m.c. myszy w obecności antygeny KLH odnotowano wzrost miana o ok. 52% w porównaniu do samego antygeny.

Na tej podstawie widać wyraźnie, że składnik propolisu CAPE odgrywa rolę immunoadjuwantu, jeśli zostanie wprowadzony do organizmu myszy wraz z antygenem. W jego obecności wytwarzanie przeciwciał IgM znacznie wzrasta.

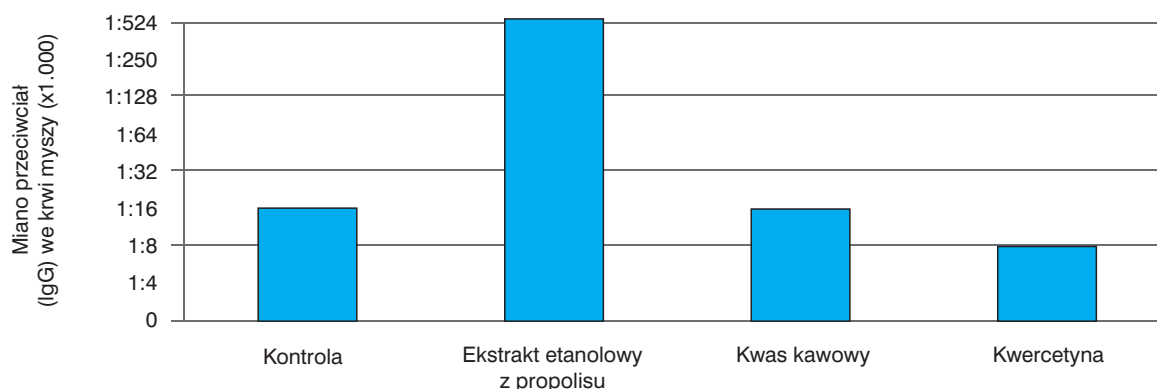
Badania Sforcin i wsp. (21) wykazały, że immunizowanie szczurów za pomocą surowicy krwi bydlęcej (BSA) w obecności ekstraktu etanolowego

z propolisu spowodowało wyraźny wzrost przeciwciał IgG we krwi zwierząt po 15 dniach doświadczenia (miano 1:524 000) w porównaniu do szczurów immunizowanych tylko za pomocą surowicy krwi bydlęcej (miano 1:16 000). W badaniach użyto 0,4 ml 10% ekstraktu etanolowego z propolisu oraz 4 mg BSA w 0,5 ml niekompletnego adjuwantu Freund'a na dawkę. Substancję podawano podskórnie 2 razy dziennie przez 3 pierwsze dni doświadczenia. Natomiast podawanie kwasu kawowego i kwercetyny jako immunoadjuwantów nie spowodowało zwiększenia przeciwciał IgG w organizmie immunizowanych zwierząt (ryc. 10). A zatem rolę immunoadjuwantów musiały spełniać inne substancje obecne w ekstrakcie etanolowym z propolisu.

Chu (22) badał wpływ ekstraktu wodnego z propolisu na tworzenie się przeciwciał aglutynacyjnych we krwi karpia (*Carassius auratus gibelio*) w obecności szczepionki otrzymanej z pałeczek chorobotwórczego

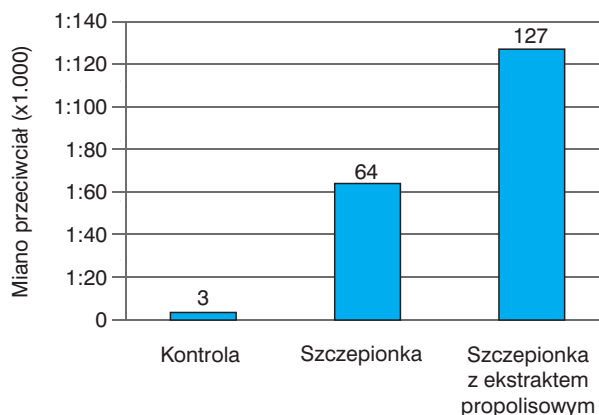


Ryc. 9. Wpływ estru fenyloetylowego kwasu kawowego (CAPE) na tworzenie się przeciwciał IgM we krwi myszy w obecności hemocjaniny z porostu skalnego (KLH) jako antygeny (wg 20)



Ryc. 10. Wpływ ekstraktu metanolowego z propolisu i jego składników na tworzenie się przeciwciał IgG we krwi szczurów immunizowanych surowicą krwi bydlęcej (BSA) (wg 21)

szczepu *Aeromonas hydrophila* (FKC). Szczepionkę otrzymano przez unieczynnienie $5 \cdot 10^{10}$ komórek/ml wymienionego drobnoustroju za pomocą 0,4% formaliny. Karpie immunizowano jednorazowo za pomocą 0,2 ml szczepionki podawanej dootrzewnowo. Ekstrakt wodny z propolisu podawano rybom w ilości 50 mg/kg m.c. Poziom przeciwciał kontrolowano przez 8 tygodni. Stwierdzono, że najwyższy poziom we krwi karpia osiągały one po 5 tygodniach od dnia immunizacji (ryc. 11). Po podaniu samej szczepionki miano przeciwciał we



Ryc. 11. Wpływ ekstraktu wodnego z propolisu na tworzenie się przeciwciał aglutynacyjnych we krwi karpia (*Carassius auratus gibelio*) w obecności szczepionki z pałeczek *Aeromonas hydrophila* (FKC) po 5 tygodniach (wg 22)

krwi immunizowanych ryb wynosiło 1:64 000, natomiast w przypadku szczepionki i ekstraktu propolisowego osiągnęło ono poziom 1:127 000, a zatem było ono prawie dwukrotnie wyższe.

Syamsudin i wsp. (17) określali z kolei wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na tworzenie się przeciwciał hemaglutynacyjnych we krwi myszy immunizowanych krwinkami czerwonymi barana (SRBC). SRBC podawano dootrzewnowo w ilości 5 ml/kg m.c. Natomiast 10% ekstrakt etanolowy z propolisu podawano sondą do żołądka w ilości 25, 50 i 100 mg/kg m.c. Po 15 dniach immunizacji w surowicy krwi zwierząt oznaczano poziom przeciwciał. Wyniki badań zebrane w tabeli 5 wskazują, że po podaniu ekstraktu propolisowego w ilości 25 mg/kg m.c. poziom przeciwciał hemaglutynacyjnych wzrósł o około 5%, po podaniu 50 mg/kg m.c. o około 14%, a po podaniu 100 mg/kg m.c. o około 40% w porównaniu do zwierząt immunizowanych tylko za pomocą SRBC.

Z przytoczonych powyżej badań wynika, że ekstrakty propolisowe są dość silnymi immunoadjuwantami. Za ich pośrednictwem w organizmach zwierząt immunizowanych za pomocą różnych antygenów tworzy się zdecydowanie więcej przeciwciał (immunoglobulin) niż w przypadku podania samych antygenów. Stąd istnieją propozycje wykorzystania ekstraktów propolisowych do produkcji surowic odpornościowych na skalę przemysłową.

Tab. 5. Wpływ ekstraktu etanolowego z propolisu na tworzenie się przeciwciał hemaglutynacyjnych we krwi myszy immunizowanych krwinkami czerwonymi barana (SRBC) (wg 17)

Stężenie ekstraktu propolisowego	Miano przeciwciał hemaglutynacyjnych w surowicy krwi myszy po 15 dniach immunizacji
Kontrola	4200
Propolis (25 mg/kg m.c.)	4400
Propolis (50 mg/kg m.c.)	4800
Propolis (100 mg/kg m.c.)	5900

Piśmiennictwo

1. Kiwalkina WP. Effect of propolis on immunological reactivity. *Apicult Abstr* 1970; 21:127-8.
2. Szewczenko LE, Czasowdewa DA, Pieszczanskij AN. Inhibiting activity of propolis on the influenza virus. *Chem Abstr* 1975; 82:68322e.
3. Teterew JJ. Effect of propolis on synthesis of specific agglutinins. *Veterinarija (Moskwa)* 1972; (3):41-2.
4. Aleksandrowicz JS, Daniłow LN. Baktericidnyje swojstwa propolisa. *Pczelowodstwo* 1974; (6):28.
5. Budrakowa EL. Effect of propolis on immunological indexes in tests of hiperimmunization with tetanus anatoxin. *Apicult Abstr* 1974; 25:164-5.
6. Budrakowa EL. Cellular and humoral reactions to tetanus toxoid plus propolis. *Uczen Zap Kazansk Gosudarstw Weterin Inst* 1976; 117:148-51.
7. Crisan I, Cioca V, Morffi A i wsp. Effect of propolis extract on surface antigen B of hepatitis compared to some chemical agents. *III Int Symp Apither, Portorož (Słowenia)* 1978; 17.

8. Esanu V, Prakoreanu E, Crisan J i wsp. The effect of aqueous propolis extract or rutin and of a rutin-quercetin mixture on experimental influenza virus infection in mice. *Rev Roum Med Virol* 1981; 32:213-5.
9. Olinescu R, Gidoin T, Softa T i wsp. Biochemical mechanisms induced in the pharmacodynamic effect of propolis. I. *In vitro* effect on albumin and serum proteins. *Stud Cercet Biochim* 1982; 25:158-64.
10. Król W, Czuba ZP, Scheller S. Działanie etanolowego ekstraktu propolisu (EEP) i flawonoli na chemiluminiscencję (CL) ludzkich neutrofilii. *Immunol Pol* 1986; 11:292-7.
11. Kiwalkina WP, Bałaykina AI, Piontkowskij WI. Plazmocitarnaja reakcija u białych krys immunizowanych antygenom s propolisom. W: *Cennyj produkt pszczołowodstwa – propolis* (red. V Harnaj). Izd Apimondija, Bucharest 1987; 106-10.
12. Kiwalkina WP, Biełozierowa GA, Kamałow GH. Stimulacija immunogeneza propolisom pri immunizacji żywotnych protiwoleznii Aujeszki. W: *Cennyj produkt pszczołowodstwa – propolis* (red. V Harnaj). Izd Apimondija, Bucharest 1987; 110-4.
13. Neychev H, Dimov V, Vuleva V i wsp. Immunomodulatory action of propolis. II. Effect of water-soluble fraction on influenza infection in mice. *Acta Microbiol Bulg* 1988; 23:58-62.
14. Dimov V, Ivanovska N, Manolova N i wsp. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. *Apidologie* 1991; 22:155-62.
15. Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC i wsp. Effect of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79:331-4.
16. Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC i wsp. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. *Int Immunopharmacol* 2005; 5:359-68.
17. Syamsudin TV, Dewi RM, Kusmardi AC. Immunomodulatory and *in vivo* antiplasmodial activities of propolis extracts. *Am J Pharm Toxicol* 2009; 4:75-9.
18. Tatefuji T, Izumi N, Ohta T i wsp. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull* 1996; 19:966-70.
19. Markonius M. Use of propolis components as an immunoadjuvant; US Patent Nr 5, 591, 771. *Chem Abstr* 1997;126:148485c.
20. Park JH, Lee JK, Kim HS i wsp. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenetyl ester in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* 2004; 4:429-36.
21. Sforcin JM, Orsi RO, Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol* 2005; 98:301-5.
22. Chu W-H. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Shelfish Immunol* 2006; 21:113-7.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 15.02.2019

zaakceptowano/accepted: 21.03.2019

Adres/address:

*prof. dr hab. n. farm. Bogdan Kędzia
Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich
ul. Wojska Polskiego 71B, 60-630 Poznań
tel.: +48 (61) 845-58-67
e-mail: bogdan.kedzia@iwnirz.pl