

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
KATEDRA FARMAKODYNAMIKI

**Ocena potencjału alergizującego propolisu
u ludzi i zwierząt doświadczalnych**

Katarzyna Basista-Sołtys

Promotor:

Prof. dr hab. Barbara Filipek

Kraków 2014

Podziękowania

Serdecznie dziękuję Pani Profesor Barbarze Filipek za życzliwość, pomoc oraz umożliwienie wykonania niniejszej pracy.

Podziękowania składam także Pani Teresie Dobrut za pomoc w wykonaniu badania eksperymentalnego na świnkach morskich, Pani Sylwii Luzar-Piotrowicz za wsparcie, pomoc i opiekę nad zwierzętami oraz Pani Doktor Monice Zadrożny za ocenę histopatologiczną wycinków skóry świnek morskich.

Dziękuję również pszczelarzom, którzy wzięli udział w badaniu ankietowym, Wojewódzkiemu Związkowi Pszczelarzy w Krakowie, a szczególnie Prezesowi Związku Panu Józefowi Bukowskiemu oraz Pani Agnieszce Wypasek, którzy umożliwili dystrybucję kwestionariuszy na terenie województwa małopolskiego, Podlaskiemu Związkowi Pszczelarzy w Białymstoku, Dolnośląskiemu Związkowi Pszczelarzy we Wrocławiu, Wojewódzkiemu Związkowi Pszczelarzy w Lublinie, Wojewódzkiemu Związkowi Pszczelarzy w Gorzowie Wielkopolskim, Wojewódzkiemu Związkowi Pszczelarzy w Poznaniu.

WYKAZ SKRÓTÓW

ACD - alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ang. allergic contact dermatitis)

ADP - adenozydodifosforan (ang. adenosine diphosphate)

AP-1 - proteina -1 (ang. activator protein-1)

AZS - atopowe zapalenie skóry

CAPE - ester fenyloetylowy kwasu kawowego (ang. caffeic acid phenethyl ester)

COX - cyklooksygenaza (ang. cyclooxygenase)

DNCB - dinitrochlorobenzen (ang. dinitrobenzene)

EEP - etanolowy ekstrakt propolisu (ang. ethanolic extract of propolis)

FCA - kompletny odczynnik Freund'a (ang. Freund's complete adjuvant)

FEV₁ - natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa

GC/MS - chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. gas chromatography - mass spectrometry)

GPMT - test maksymalizacji świnki morskiej (ang. Guinea pig maximization test)

ICAM-1 - cząsteczka adhezyjna międzykomórkowa 1 (ang. intercellular adhesion molecule 1)

IFN - interferon (ang. interferon)

IL-2 - interleukina-2 (ang. interleukin-2)

iNOS - indukowalna syntaza tlenu azotu (ang. inducible nitric oxide synthases)

LAF - czynnik aktywujący limfocyty (ang. lymphocyte-activating factor)

LPS - lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)

MHC - główny układ zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)

NF- κ B – czynnik jądrowy κ B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

OECD - Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (ang. Organization for Economic Cooperation and Development)

PGE₂ - prostaglandyna E₂ (ang. prostaglandin)

TNF- α - czynnik martwicy guza, czynnik nekrozy nowotworów (ang. tumor necrosis factor)

Spis treści

1. Wstęp	6
1.1. Wprowadzenie.....	7
1.2. Farmakologia.....	7
1.2.1. Działanie przeciwdrobnoustrojowe	7
1.2.2. Działanie przeciwzapalne	8
1.2.3. Działanie miejscowo-znieczulające.....	9
1.2.4. Działanie ułatwiające gojenie się ran	9
1.2.5. Działanie przeciwutleniające	9
1.2.6. Działanie immunostymulujące	10
1.2.7. Inne właściwości.....	10
1.3. Działanie alergizujące	11
1.3.1. Alergeny zawarte w propolisie	12
1.3.2. Alergia na propolis	15
1.3.2.1 Alergia na propolis w grupach zawodowych	15
1.3.2.2. Alergia na propolis w ogólnej populacji	16
1.3.2.3. Alergia na propolis u chorych dermatologicznych	16
1.3.2.4. Alergia na propolis u astmatyków i osób z innymi chorobami o podłożu alergicznym	17
1.3.2.5. Alergia na propolis u dzieci i młodzieży	18
1.4. Działanie drażniące	19
2. Cel i założenia pracy	21
3. Metodyka badań	23
3.1. Badanie kwestionariuszowe wśród pszczelarzy	23
3.2. Ocena działania alergizującego propolisu w teście maksymalizacji świnki morskiej (GPMT)	25
3.3. Badania histopatologiczne, leukogram oraz oznaczenie poziomu interferonu gamma. 29	
4. Wyniki	30
4.1. Analiza ankiet uzyskanych od pszczelarzy	30
4.2. Działanie alergizujące w teście maksymalizacji świnki morskiej (GPMT).....	36
4.3. Wyniki badania histopatologicznego oraz wpływu na leukogram i poziom interferonu gamma.....	40
5. Dyskusja	60

6. Wnioski	73
7. Streszczenie	74
8. Piśmiennictwo	77

1. Wstęp

1.1. Wprowadzenie

Propolis, inaczej zwany kitem pszczelim, to mieszanina substancji żywicznych zbieranych przez pszczoły robotnice, głównie z pąków topoli, brzozy i drzew iglastych. Jest on używany przez pszczoły jako wielofunkcyjny materiał do uszczelniania i naprawy ula oraz do zabezpieczenia roju przed chorobami. Stanowi swojego rodzaju środek dezynfekujący, który powoduje, że wnętrze ula jest mikrobiologicznie sterylne - pozbawione wirusów, bakterii i grzybów [1,2].

Propolis cieszy się długą historią stosowania. Istnieją wzmianki o używaniu tego surowca przez starożytnych Egipcjan, Rzymian i Greków, głównie do balsamowania zwłok, ale także propolis był już wtedy wykorzystywany do leczenia i odkażenia ran. Najważniejsze i najbardziej znane właściwości propolisu to jego przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybiczne, przeciwzapalne oraz miejscowo-znieczulające działanie, dlatego obecnie jest on wykorzystywany wspomagająco w leczeniu infekcji, ran i oparzeń, zapalenia gardła, hemoroidów oraz po operacjach ginekologicznych, gdzie wykorzystuje się jego działanie antyseptyczne i przyspieszające regenerację błon śluzowych i ran [3,4].

Skład propolisu zależy od strefy klimatycznej, a co za tym idzie od roślinności występującej na danym obszarze. Ogólnie w skład propolisu wchodzi: żywice (50-80%), wosk pszczeli (8-30%), wosk roślinny (6%), olejki eteryczne (10-14%), pyłek kwiatowy (5%), substancje garbnikowe (10%), domieszki mechaniczne (5%), substancje lipidowo-białkowe, witaminy. Wśród kwasów aromatycznych wymienia się: cynamonowy, kawowy, ferulowy, benzoesowy, salicylowy i 2-amino-3-metoksybenzoesowy. Do najważniejszych estrów aromatycznych zalicza się estry etylowe kwasu cynamonowego i kawowego oraz fenyletylowe kwasu benzoesowego. Najczęściej wykrywano w propolisie takie flawonoidy jak: chryzyna, tektochryzyna, pinostrobin, apigenina i chalkon pinostrobinowy, rzadziej galanginę, kemferol, genkwaninę czy pinobanksynę. Z pozostałych związków występujących w polskim propolisie warto wymienić: związki lotne (geraniol, nerol, farnesol, β -eudesmol, kariofilen, patchulen), inne związki aromatyczne (kumaran, wanilinę), węglowodory (eikosan, trikosan, pentakosan, heksadekanol), alkohole triterpenowe (cholinasterol, fukosterol, stigmasterol), enzymy (amylazy, esterazy) i mikroelementy (m. in. mangan, żelazo, krzem, magnez, cynk, selen, chrom), [4-6].

1.2. Farmakologia

Propolis znalazł szerokie zastosowanie w medycynie jako środek o właściwościach bakteriobójczych, przeciwwirusowych, przeciwgrzybiczych, immunostymulujących, przeciwzapalnych, miejscowo-znieczulających, przeciwłuszczycowych, antyoksydacyjnych, przeciwnowotworowych, hepatoprotekcyjnych, cytoprotekcyjnych i przyspieszających gojenie się ran, w tym ran pooparzeniowych i owrzodzeń. Ogólne wskazania medyczne do stosowania propolisu to: leczenie infekcji, leczenia ran i oparzeń, w zapaleniach gardła, po ekstrakcji zęba, do leczenia hemoroidów i wspomagająco po operacjach ginekologicznych jako środek działający antyseptycznie i regenerująco na błony śluzowe i rany. W Polsce zarejestrowanych jest 5 leków z propolisem jako substancją czynną. Preparaty w postaci sprayu, kropli i pudru przeznaczone są głównie do leczenia ran i stanów zapalnych skóry bądź gardła, natomiast w postaci maści i żelu przeznaczone do leczenia oparzeń i ran [18].

Liczne wyniki badań eksperymentalnych i klinicznych potwierdzają jego dużą aktywność farmakologiczną [4,6,7,8,9,10].

1.2.1. Działanie przeciwdrobnoustrojowe

Wyniki badań eksperymentalnych potwierdzają silną aktywność przeciwbakteryjną, przeciwgrzybiczą, przeciwpierwotniakową i przeciwwirusową propolisu w stosunku do różnych szczepów.

Największą wrażliwość na działanie etanolowego ekstraktu propolisu (EEP) wykazują bakterie: gronkowce *Staphylococcus epidermidis*, mikrokokki, dwoinki kataralne (*Branhamella catarrhalis*), dwoinki zapalenia płuc, paciorkowce (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*) i paciorkowce zieleniejące, prątki gruźlicy (*Mycobacterium tuberculosis*), laseczki tlenowe (*Bacillus*), beztlenowce (m. in. *Bacteroides*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*), maczugowce (*Corynebacterium*), promieniowce (*Streptomyces*), krętki blade (*Treponema pallidum*), a także pierwotniaki wywołujące rzęsistkowice (*Trichomonas vaginalis*), toksoplazmozę (*Toxoplasma gondii*), lambliozę (*Gardia lamblia*) oraz dermatofity (grzyby pleśniowe wywołujące grzybice skóry, włosów i paznokci), w tym *Trichophyton rubrum*, i grzyby drożdżoidalne, głównie z rodzaju *Candida albicans* [4].

Potwierdzeniem skuteczności ekstraktu propolisu są badania *in vitro* przeprowadzone na grzybach z rodzaju *Candida albicans* i *Candida non-albicans* wyhodowanych z wymazów pochwojących 97 pacjentek z zapaleniem pochwy. Obserwowana w tych badaniach wysoka

skuteczność przeciwgrzybicza propolisu sugeruje możliwość jego wykorzystania w stanach zapalnych pochwy wywołanych namnażaniem się grzybów z rodzaju *Candida albicans* [28]. Skuteczność 5% ekstraktu propolisu potwierdzono również w badaniach *in vivo* u 54 pacjentek z nawrotowym zapaleniem pochwy. Badania wykazały, że propolis stosowany w postaci irygacji raz dziennie przez 7 dni skutecznie zmniejsza objawy przewlekłych stanów zapalnych pochwy i może być stosowany jako leczenie alternatywne [29].

Propolis wykazuje również aktywność przeciwwirusową. Wrażliwość na propolis wykazują wirusy grypy (A/H1N1, A/H3N2), opryszczki (*Herpes simplex*), w tym opryszczki narządów płciowych u kobiet, zapalenia opon mózgowych, pryszczycy. Stwierdzono, że związki flawonoidowe występujące w dużej ilości w propolisie, są inhibitorami proteiny HIV-1. W badaniach *in vitro* wykazano hamujący wpływ propolisu na replikację HIV-1 i ekspresję antygeny p-24 [4,7,33,34,35].

1.2.2. Działanie przeciwzapalne

Aktywność przeciwzapalna propolisu jest znana od dawna, ale ciągle dyskutowany jest mechanizm działania. Jak wykazały wyniki wielu badań eksperymentalnych, wyciągi wodne i alkoholowe z propolisu redukują znamienne ostre stany zapalne prowokowane zymosanem, zmniejszają obrzęk łapy szczura indukowany serotonina, karagenina, kapsaicyna czy obrzęk ucha myszy wywołany olejem krotonowym [36,37,38]. Obserwowane działanie przeciwzapalne jest wynikiem zmniejszenia uwalniania histaminy przez mastocyty, hamowaniem aktywności hialuronidazy, a także zmniejszeniem stężenia produktów przemiany kwasu arachidonowego (leukotrieny, PGE₂) w wyniku hamowania lipooksygenazy i cyklooksygenazy [39]. Propolis w stężeniu do 0.03% znamienne hamował aktywność COX w homogenatach z płuc szczurów po podaniu soli fizjologicznej lub lipopolisacharydu (LPS) [42,43,44].

W warunkach *in vitro* ekstrakt etanolowy propolisu obniżał produkcję tlenu azotu w stymulowanych lipopolisacharydem z *Escherichia coli* (LPS) plus interferonem gamma (IFN- γ) komórkach RAW 264.7 (IC₅₀ – 41,60 μ g/ml) oraz blokował aktywność lucyferazy w TNF- α stymulowanych komórkach HEK 293 transfekowanych z NF- κ B-lucyferazy genem reporterowym, regulowanym przez czynnik jądrowy κ B (NF- κ B), (IC₅₀ = 200 μ g/ml) [45,46,47,48]. Wyniki badań wskazują, że aktywność przeciwzapalna i przeciwbólowa może być także związana z hamowaniem ekspresji genu COX-2, a także genu iNOS poprzez interferencję z miejscami NF- κ B w iNOS promotorze [37,45,46].

Dootrzewnowa iniekcja ekstraktu etanolowego z zielonego propolisu brazylijskiego hamowała reakcję bólową w teście „wicia się” u myszy indukowaną kwasem octowym (wartość $IC_{50} = 0.75 \pm 0.05$ mg/kg) [37].

1.2.3. Działanie miejscowo-znieczulające

Alkoholowy wyciąg propolisowy odznacza się silnym działaniem miejscowo-znieczulającym. W badaniach wykazano, że działanie miejscowo-znieczulające wyciągu etanolowego propolisu oznaczone na gałce ocznej królika było 3,5 razy silniejsze od kokainy i 52 razy silniejsze od prokainy, a na grzbiecie świnki morskiej wielokrotnie silniejsze i dłuższe od kokainy i ksylokainy [36,49]. W teście Randalla-Sellito propolis podany dootrzewnowo w zakresie dawek 3-30 mg/kg znamienne zmniejszał ból wywołany podpowięziowym wstrzyknięciem bradykininy. Podobnie propolis, podany w zakresie dawek 3-30 mg/kg dootrzewnowo lub 25-100 mg/kg doustnie, hamował ból wywołany kapsaicyną [49].

1.2.4. Działanie ułatwiające gojenie się ran

Pod wpływem etanolowych i wodnych wyciągów z propolisu obserwowano intensywną odnowę ubytków skórnych u myszy, świnek morskich i psów, szybsze gojenie się skaryfikowanej skóry u królików, ran poparzeniowych u myszy, szczurów i świnek morskich oraz ułatwienie gojenia się chemicznych uszkodzeń rogówki oka u królików, przyspieszoną odnowę miazgi zębowej u psów i królików, zmniejszenie stanów zapalnych i degeneracyjnych tkanki zębowej [6,50,51,52,53,54,55].

Z porównania skuteczności soli srebrowej sulfadiazyny - preparatu zalecanego z wyboru w miejscowej terapii oparzeń - z maścią propolisową w gojeniu doświadczalnych ran poparzeniowych, indukowanych u świni domowej rasy biała zwisłoucha wynika wyższa skuteczność przeciwdrobnoustrojowa maści propolisowej w stosunku do soli srebrowej sulfadiazyny. Korzystniejsze działanie maści propolisowej przejawiało się znacznie większą redukcją liczby drobnoustrojów, jak i skuteczniejszym działaniem bakteriobójczym zastosowanego apiterapeutyku, względem wyizolowanych szczepów [51]. Podobne działanie zapobiegające infekcji o charakterze ropnym w obrębie rany poparzeniowej ze skróceniem czasu ich gojenia oraz zmniejszeniem blizn opisała również Kabała-Dzik i wsp. [54].

1.2.5. Działanie przeciwutleniające

W licznych badaniach eksperymentalnych wykazano, że ekstrakt propolisu ma zdolność „zmiatania” wolnych rodników, które są odpowiedzialne za peroksydację

tłuszczy i białek [56]. Proces ten uszkadza strukturę cząsteczek białkowych, co w konsekwencji prowadzi do zmiany ich właściwości biologicznych i może być przyczyną wielu poważnych chorób, w tym nowotworowych.

W modelach *in vitro* wykazano właściwości neuroprotektoryjne dla wyciągów propolisowych oraz obecnych w wyciągu kwasów 3,4-dikawoilochinowego, 3,5-dikawoilochinowego oraz chlorogenowego i kwasu p-kumarowego. Efekt neuroprotektoryjny jest wynikiem działania hamującego lipidową peroksydację, co wykazano w homogenatach mysich [37]. Wang i wsp. [57] wykazali, że występujący w propolisie ester fenetylowy kwasu kawowego ma silne działanie hamujące powstawanie wolnych rodników i tym samym może zapobiegać uszkodzeniu lipidów, DNA i białek, co może mieć istotne znaczenie w zwalczaniu różnych typów nowotworów. Również Russo i wsp. [58] sugerują, że za działanie antyoksydacyjne propolisu w dużej mierze odpowiada ester fenetylowy kwasu kawowego i galangina, nie mniej propolis pozbawiony CAPE także wykazuje słabe działanie antyoksydacyjne.

Wyniki badań uzyskane u myszy po naświetlaniu promieniami gamma wskazują, że propolis i jego polifenolowe związki podane przed naświetlaniem ochraniają myszy przed śmiertelnymi skutkami naświetlania całego ciała, a łączne podanie epirubicyny i wodnych wyciągów propolisu nasila działanie chemoterapeutyku i minimalizuje reakcje po chemoterapii i radioterapii [59,60,61,62]. Wyniki te sugerują, że propolis i polifenolowe związki obecne w propolisie mogą być w przyszłości wykorzystane we wspomagającym leczeniu pacjentów skazanych na radioterapię.

1.2.6. Działanie immunostymulujące

Wyciągi z propolisu przyspieszają migrację i ruchliwość makrofagów, stymulują produkcję interferonu- γ , zwiększają uwalnianie czynnika aktywującego limfocyty (LAF), zwiększają syntezę przeciwciał unieszkodliwiających wirusy wywołujące chorobę Aujeszky'ego u świń, co świadczy o ich działaniu immunostymulującym [18,63]. Sforcin i wsp. [64] wykazali, że propolis stymuluje produkcję przeciwciał u immunizowanych albuminami wołowymi szczurów, co potwierdza jego działanie immunomodulujące.

1.2.7. Inne właściwości

W badaniach eksperymentalnych na szczurach wykazano również, że wyciągi etanolowe z propolisu działają hepatoprotekcyjnie, osłaniając tkankę wątrobową przed szkodliwym działaniem acetaminofenazonu, paracetamolu, czterochlorku węgla, alkoholu

etylowego, azotynu sodowego, tamoksyfenu i arsenu [10,65,66,67,68,69,70] oraz żółciopędnie i żółciotwórczo.

Poza tym opublikowane przez De Barros'a [71,72] wyniki badań wykazały, że ekstrakt propolisu, w zakresie dawek 50-500 mg/kg, zmniejsza sekrecję soku żołądkowego i prawie 4-krotnie zmniejsza powierzchnię wrzodów wywołanych u szczurów indometacyną, stresem i etanolem oraz przyspiesza ich gojenie. Abel-Latif [73] zwraca uwagę, że CAPE hamuje *Helicobacter pylori*-indukowaną ekspresję jądrowego czynnika NF- κ B, proteiny-1 (AP-1) i COX-2 w nabłonkowych liniach komórek żołądka, co może odrywać istotną rolę w hamowaniu procesu zapalnego indukowanego *Helicobacter pylori*.

Z innych właściwości propolisu należy wymienić jego działanie cytotoksyczne wobec hodowli tkankowych nowotworów ludzkich KB, HuH13, HT-1080, 26-L5, SNU449 i Hela oraz aktywność przeciwnowotworową w nowotworze sutka u myszy, jak również nowotworze puchliny wodnej Ehricha u szczurów [74,75,76,77], działanie hipoglikemiczne, obniżające poziom cholesterolu i ciśnienie tętnicze, a także hamujące agregację płytek krwi indukowaną ADP (adenozynodifosforan), adrenaliną i kolagenem [4,18,78].

Ponadto propolis regeneruje tkankę chrzęstną i kostną. W badaniach na ludzkich kulturach komórkowych chrząstki wykazano, że propolis redukuje syntezę NO i zwiększa uwalnianie glikoaminoglikanów [45].

1.3. Działanie alergizujące

Propolis według licznych doniesień uważany jest za nietoksyczny i bezpieczny. Jego wartość LD₅₀ dla myszy waha się w granicach 2.000 – 7.300 mg/kg. Po podaniu doustnym 4.000 mg/kg/dzień przez dwa tygodnie oraz po podaniu w wodzie do picia 1400 mg/kg/dzień przez 90 dni nie obserwowano u myszy, ani u szczurów po podaniu dawki 2740 mg/kg/dzień przez 60 dni działań niepożądanych [6-20]. Jedynym ewentualnym działaniem niepożądanym z jakim należy się liczyć jest możliwość wystąpienia reakcji alergicznych na propolis, przy czym generalnie uważa się, że podawany doustnie uczuła bardzo rzadko. Znacznie częściej występują reakcje alergiczne na skutek miejscowego stosowania propolisu. Reakcje alergiczne na propolis najczęściej sprowadzają się do kontaktowego zapalenia skóry, mającą postać wyprysku z towarzyszącym świądem.

Odnośnie potencjału alergizującego propolisu istnieją sprzeczne dane. Według jednych doniesień odsetek osób uczulonych na propolis waha się od 1,2 – 6,6% (Walgrave, 2005); według innych od 0 do 9% (Bogdaszewska-Czabanowska, 1980), [21,22]. Ponadto istnieją grupy zawodowe narażone na większą ekspozycję na alergeny zawarte w propolisie. Początkowe doniesienia o alergii na propolis pochodziły od pszczelarzy mających codzienny kontakt z surowcem, a także od muzyków, czy artystów modułujących figurki z wosku [11,12]. Sugeruje się również, że rozpuszczalniki ułatwiają rozwój alergii na propolis, co może być wynikiem ułatwienia transportu antygenów obecnych w propolisie do głębszych warstw skóry [14,15,16].

1.3. 1. Alergeny zawarte w propolisie

Propolis jest lepłą substancją żywiczną powstającą z żywic roślinnych zebranych przez pszczoły z pączków i młodych pędów topoli, brzozy, świerku, kasztanowca i innych drzew oraz roślin zielonych.

Propolis powstający z żywic roślinnych zebranych przez pszczoły z pączków i młodych pędów topoli, brzozy, świerku, kasztanowca i innych drzew oraz roślin zielonych jest mieszaniną wielu alergenów, z których głównymi są estry kwasu kawowego (np. ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego, kawainian benzylu, kawainian geranylu) i cynamonowego (np. cynamonian cynamylu, cynamonian benzylu, alkohol cynamonowy). Ich zawartość w propolisie różni się w zależności od surowca, jaki znajduje się w pobliżu pszczelich uli.

W Europie Środkowej, w tym w Polsce, estry kwasu kawowego - występujące w pąkach topoli - uznawane są za grupę związków o silnych właściwościach alergizujących i to one mogą być odpowiedzialne za wywoływanie nadwrażliwości kontaktowej na propolis [4,79]. Substancje te mogą również występować w innych produktach pochodzenia roślinnego. Stąd po miejscowym podaniu propolisu może dochodzić do alergii krzyżowej z innymi produktami zawierającymi te składniki. Dość często opisywana jest reakcja krzyżowa z balsamem peruwiańskim, kalafonią, terpentyną, olejkami eterycznymi, substancjami zapachowymi itp. [14,35].

Najważniejszym alergenem kontaktowym zidentyfikowanym w propolisie jest związek LB-1 (składający się głównie z trzech estrów pentenylowych kwasu kawowego) pochodzący z pączków topoli, co zostało potwierdzone przez Hausena i wsp. [80]. Wykonali oni testy z użyciem wyciągu z pąków topoli na uwrażliwionych na propolis

oraz na uwrażliwionych na LB-1 świnkach morskich. Rezultatem była silna reakcja alergiczna w obu przypadkach. Ponadto LB-1 został wykryty w różnych próbkach propolisu pochodzących z różnych źródeł. Pierścień aromatyczny związku LB-1 może zostać łatwo utleniony do chinonów (orto- lub para-chinonu), które są znanymi silnymi alergenami [81]. Za pomocą analizy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MS) został określony dokładny skład związku LB-1, a mianowicie: 3-metylo-2-butylo-kawainian (54,2%), 3-metylo-3-butylo-kawainian (28,3%), 2-metylo-2-butylo-kawainian (4,3%), kawoilan fenetylu (7,9%), kwas kawowy (1,3%), kawainian benzylu (1,0%). Oznacza to, iż ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego wraz z jego dwoma izomerami (3-metylo-2-butylo-kawainian, 3-metylo-3-butylo-kawainian, 2-metylo-2-butylo-kawainian) stanowią 86,8% mieszaniny LB-1 i odgrywają najważniejszą rolę w powstawaniu nadwrażliwości kontaktowej na propolis [81].

Drugim ważnym alergenem kontaktowym w propolisie jest ester fenetylowy kwasu kawowego (kawoilan fenetylu (CAPE)), który, pomimo, iż występuje w mniejszej ilości niż LB-1 to wykazuje podobne właściwości alergizujące. Po podaniu takich samych niskich stężeń (0,1%) tych dwóch alergenów uzyskano podobną odpowiedź [82].

Trzecim ważnym alergenem kontaktowym jest salicylan benzylu. Ten związek jest alergenem o średniej sile alergizującej, ale jednak może prowadzić do wystąpienia reakcji krzyżowych u pacjentów nadwrażliwych na propolis po zastosowaniu niektórych kosmetyków, w których znajduje się salicylan benzylu [81].

Czwartym ważnym alergenem kontaktowym jest cynamonian benzylu, który autorzy tej publikacji uznali za słaby alergen [82]. Hausen i wsp. udowodnili, iż za nadwrażliwość na propolis odpowiedzialny jest nie tylko główny składnik LB-1, ale także kilka innych wymienionych powyżej alergenów. Najważniejszą grupą o działaniu alergizującym pozostają pochodne kwasu kawowego. W Tabeli 1 przedstawiono zestawienie najważniejszych alergenów zawartych w propolisie wraz z siłą działania alergizującego [83].

Tabela 1. Zestawienie najważniejszych alergenów zawartych w propolisie wraz z siłą działania alergizującego

Alergen	Stopień alergizacji*	Klasyfikacja alergenów**	Stężenie w propolisie
Ester 1,1-dimetyloallilowy kwasu kawowego	2,23	silny	średnie do wysokiego
Ester benzyłowy kwasu kawowego	1,87	silny	niskie do wysokiego
Ester benzyłowy kwasu izoferulowego	1,20	silny	niskie
Ester cynamyłowy kwasu kawowego	1,48	średni	niskie
Ester fenetyłowy kwasu kawowego	1,26	średni	nie oznaczono
Ester fenetyłowy kwasu izoferulowego	0,81	średni	niskie
Wanilina	1,17	słaby	niskie
Ester benzyłowy kwasu ferulowego	0,88	słaby	niskie
Alkohol cynamonowy	0,57	słaby	niskie
Ester cynamyłowy kwasu izoferulowego	0,45	słaby	niskie
Ester cynamyłowy kwasu cynamonowego	0,43	słaby	śladowe ilości
Ester benzyłowy kwasu benzoowego	0,17	słaby	śladowe ilości
Ester 3-metylo-2-butenyłowy kwasu izoferulowego	0,32	słaby	niskie
Kwas benzoowy	0,15	słaby	niskie do wysokiego
Kwas cynamonowy	0,15	słaby	niskie do wysokiego
Alkohol benzyłowy	1,00	słaby	średnie
Nerolidol	0,28	słaby	niskie
Kwercetyna	0,65	słaby	nie oznaczono
Naryngenina	0,50	słaby	nie oznaczono
Akacetyna	0,40	słaby	nie oznaczono
Chryzyna	0,05	słaby	nie oznaczono

* na podstawie ilorazu sumy wszystkich reakcji alergicznych i liczby badanych zwierząt po wywołaniu reakcji alergicznej przy użyciu alergenu w stężeniu 0,1%

**ze względu na właściwości alergizujące wg Hausen [80]

1.3.2. Alergia na propolis

Propolis podany *per os* jest uznawany za produkt nietoksyczny dla ludzi, chociaż w piśmiennictwie cytowane są przypadki wystąpienia nadwrażliwości po podaniu doustnym, które wystąpiły u osób pijących w celach terapeutycznych stężone alkoholowe wyciągi propolisu przez długi okres (miesiące, niekiedy lata).

Generalnie uważa się, że propolis podawany doustnie uczuła bardzo rzadko [14,84]. Znacznie częściej opisywane są przypadki nadwrażliwości na propolis i jego preparaty stosowane zewnętrznie. Szczególnie dużo doniesień o nadwrażliwości na propolis pojawiło się w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych, kiedy wzrosło znacznie zainteresowanie propolisem ze względu na liczne doniesienia potwierdzające jego dużą aktywność biologiczną [83,84].

Reakcje alergiczne na propolis najczęściej sprowadzają się do alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, jakkolwiek istnieją pojedyncze doniesienia o nadwrażliwości na kit pszczeli objawiającej się nieżytem nosa, zapaleniem spojówek, zapaleniem błon śluzowych jamy ustnej i owrzodzeniami, skurczami oskrzeli połączonymi z dusznością i świszczącym oddechem, gorączką, pokrzywką, bólem głowy, nudnościami [84]. Opisano również pojedynczy przypadek wstrząsu anafilaktycznego wraz z obrzękiem krtani po miejscowym zastosowaniu propolisu w leczeniu ostrego zapalenia jamy gardłowo-nosowej [85].

1.3.2.1. Alergia na propolis w grupach zawodowych

Pszczelarze mający codzienny kontakt z surowcem, a także muzycy, czy plastycy modulujący figurki z wosku są grupami zawodowymi najbardziej narażonymi na wystąpienie alergii na propolis [11,12]. Pomimo, iż alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD) po propolisie wydaje się być rzadkie [14], to jednak kilka przypadków alergii na propolis u pszczelarzy zostało opisanych [86,87,88,89].

Pierwszy opisany przypadek ACD po propolisie został opublikowany w 1915 roku i dotyczył pszczelarza, u którego wystąpiły zmiany na rękach. Od tamtego czasu propolis jest rozpoznany jako zawodowy kontaktowy alergen głównie u pszczelarzy. Przegląd piśmiennictwa światowego wskazuje, że ¼ osób uczulonych na propolis to właśnie pszczelarze. Badanie przeprowadzone na populacji niemieckich pszczelarzy wykazało, że 3,6% ankietowanych jest uczulonych na propolis (37 z 1051 osób), a ponad 72% z nich jest

uczulona na inne substancje (21 z 37 pszczelarzy uczulonych na propolis), [16,17]. W badaniach przeprowadzonych wśród polskich pszczelarzy wykazano, iż uczulenie na propolis może się wahać w granicach 0,76% - 4,04% [89,90].

Z analizy rodzaju uczuleń kontaktowych występujących u rolników na obszarze Polski w latach 1991-1999 dokonanych przez Śpiewaka [92] wynika, że u 2% rolników przyczyną rozpoznanego alergicznego kontaktowego zapalenia skóry był propolis. Również wśród badanych rolników w Instytucie Medycyny Pracy z powodu podejrzenia choroby zawodowej skóry uczulenie na propolis stwierdzono u 1 rolnika na 132 badanych (0.76 %), [91].

Ponadto opisano w literaturze cztery przypadki wystąpienia kontaktowego zapalenia skóry powietrzno-pochodnego po propolisie. Trzy z nich dotyczyły osób wykonujących zawód pszczelarza [93,94,95]. Powietrzno-pochodne kontaktowe zapalenie skóry wydaje się być niezmiernie rzadkim zjawiskiem.

1.3.2.2. Alergia na propolis w ogólnej populacji

Z danych literaturowych wynika, że wystąpienie nadwrażliwości kontaktowej na kit pszczelej jest mniejsze u osób zdrowych, nieleczonych z powodu dermatoz i waha się w granicach 0,64% - 1,3% [88,95,95,97]. Potwierdzeniem są badania przeprowadzone przez Hegyi i wsp. [97] w latach 1981-87 na 1558 zdrowych ochotnikach oraz 7483 osobach hospitalizowanych z powodu dermatoz alergicznych. Uczulenie na propolis w zdrowej populacji wystąpiło zaledwie u 10 osób, co stanowi 0,64%. Podczas, gdy w grupie osób z dermatozami alergicznymi uczulenie stwierdzono u 136 osób (1,82%). W Wiedniu i w Budapeszcie nadwrażliwość na propolis wykazało jedynie 1,3% badanej populacji zdrowych ochotników [98].

1.3.2.3. Alergia na propolis u chorych dermatologicznych

Nadwrażliwość w postaci alergicznego kontaktowego zapalenia skóry na alkoholowy ekstrakt propolisowy częściej występuje u chorych dermatologicznych, leczonych wcześniej z powodu dermatoz alergicznych 1,2% - 6,7% (średnio 3,82%), [95,99-105]. W Polsce nadwrażliwość kontaktowa na kit pszczelej występuje u 3 - 5% chorych z wypryskiem [15].

Szerokie badanie na dość licznej grupie pacjentów (1008) z dermatozą okolicy odbytu i narządów płciowych przyjętych do 21 klinik dermatologicznych w latach 1992 do 1997 wykazało, że około 2,8% pacjentów miało odczyn dodatni na propolis w testach płatkowych

[105]. Podobne badanie przeprowadzone w latach 1999-2003 w niemieckich klinikach dermatologicznych również u chorych z dermatozami okolic odbytu i narządów płciowych wykazało, że 3,1% pacjentów z tej grupy chorych było uczulonych na propolis. Ponadto autorzy tej pracy donoszą, iż nie istnieje żadne znacząco wyższe ani niższe ryzyko wystąpienia uczulenia u poddanych testom pacjentom z dermatozą okolicy odbytu i narządów płciowych w przypadku naturalnego środka leczniczego propolisu (3,1% pacjentów) oraz antybiotyku gentamycyny (3,8% pacjentów uczulonych) w stosunku do populacji ogólnej [106]. W badaniu przeprowadzonym u 64 pacjentów z podejrzeniem alergii kontaktowej wykonano testy płatkowe z 10% propolisem. Dodatni wynik uzyskano u 6% badanych, co potwierdza stopień alergii u chorych dermatologicznych, który, w zależności od ośrodka, w którym zostały one wykonane, waha się od 1,2 % - 6,7 % [107].

1.3.2.4. Alergia na propolis u astmatyków i osób z innymi chorobami o podłożu alergicznym

Przegląd piśmiennictwa światowego nie wskazuje na jednoznaczne potwierdzenie związku pomiędzy uczuleniem kontaktowym na propolis a astmą.

W latach 2002 do 2007 do narodowego systemu nadzoru nad naturalnymi produktami kierowanego przez Włoski Narodowy Instytut Zdrowia wpłynęło 18 zgłoszeń podejrzanym działaniom niepożądanych po preparatach zawierających propolis. 16 z nich dotyczyło reakcji alergicznych (objawy dermatologiczne bądź z układu oddechowego), a u 2 osób wystąpiły dolegliwości żołądkowo-jelitowe. W 7 przypadkach, z czego aż 4 dotyczyły dzieci, stwierdzono predyspozycję alergiczną (pacjenci z atopią albo dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku atopii bądź astmy). Autorzy stwierdzają, że atopowi i astmatyczni pacjenci mogą być grupą zwiększonego ryzyka wystąpienia reakcji alergicznych po preparatach z propolisem. Taka teza została oparta na 3 publikacjach, z których dwie nie dotyczą propolisu, a jedynie mlecza pszczelego i pyłku kwiatowego zbieranego przez pszczoły, a dotycząca propolisu nie udowadnia większego ryzyka wystąpienia nadwrażliwości u astmatyków i osób z atopią. Dodatkowo u trzech pacjentów podawano złożone preparaty zawierające oprócz propolisu inne substancje roślinne, które również mogły być odpowiedzialne za wystąpienie reakcji alergicznych [108].

Stwierdzenie, iż choroby alergiczne i astma oskrzelowa zwiększają ryzyko wystąpienia nadwrażliwości na propolis może okazać się prawdziwe, jednak dalsze badania w tej kwestii powinny potwierdzić tezę postawioną w tej publikacji. Na podstawie jednej publikacji i braku pewności, że alergenem był propolis nie można ocenić związku pomiędzy

wystąpieniem alergii na propolis a występowaniem astmy. Tym bardziej, że pojawiają się doniesienia o korzystnym działaniu antyalergicznym propolisu oraz estru fenyloetylowego kwasu kawowego, składnika aktywnego propolisu. W badaniu przeprowadzonym na myszach z modelem astmy wywołanej przez dootrzewnowe podanie owalbuminy udowodniono, iż CAPE (ester fenyloetylowy kwasu kawowego) może być przydatny jako terapia adjuwantowa astmy oskrzelowej poprzez zmniejszanie stresu oksydacyjnego [109].

Badanie wykonane na 22 pacjentach cierpiących na astmę oskrzelową (postać łagodna do umiarkowanej), którym podawano przez 2 miesiące ekstrakt z propolisu plus teofilinę wykazało, że u tych pacjentów zmniejszyła się ilość i nasilenie ataków nocnych, poprawiła się funkcja płuc (o 30% zwiększyła się FEV₁ – natężona objętość wydechowa pierwszosekundowa), zmniejszyło się stężenie prozapalnych cytokin w porównaniu do placebo, tj. 24 pacjentów otrzymujących samą teofilinę. Uzyskane wyniki sugerują możliwość zastosowania propolisu jako terapii adjuwantowej u chorych na astmę z nasileniem łagodnym do umiarkowanego [110].

1.3.2.5. Alergia na propolis u dzieci i młodzieży

Dane literaturowe wskazują na to, że propolis wywołuje częściej dodatnie odczyny w testach płatkowych u dzieci, szczególnie z chorobami dermatologicznymi.

Przeprowadzone badania na 1255 dzieciach w wieku od 7 miesiąca do 12 roku życia z podejrzeniem alergicznego kontaktowego zapalenia skóry wykazały, że 74 dzieci (5,9%) miało dodatni odczyn na propolis, u 4 dzieci wynik był wątpliwy, natomiast u 1177 (93,8%) negatywny. 39% dzieci uczulonych na propolis chorowało na atopowe zapalenie skóry. 76% dzieci wykazywało dodatni wynik w testach płatkowych na inne alergeny. Powyższe dane mogą przemawiać za możliwym związkiem pomiędzy wystąpieniem alergii na propolis a występowaniem chorób dermatologicznych o podłożu alergicznym, takich jak atopowe zapalenie skóry (AZS) bądź alergię na inne hapteny [102].

W innym badaniu na 1094 dzieciach w wieku od 7 miesięcy do 12 lat propolis uczulił 4,8% dzieci i znalazł się wśród głównych alergenów kontaktowych [103]. W ostatnich latach obserwuje się wzrost odsetka dzieci uczulonych na różne alergeny kontaktowe, w tym na propolis. W latach od 1988 do 1994 odsetek uczulonych dzieci na propolis wynosił 0,7%. Od 1995 do 2002 roku odsetek dzieci uczulonych na propolis zwiększył się do 5,9%. Tendencja ta może być tłumaczona większym zainteresowaniem apiterapią oraz stosowaniem naturalnej medycyny przez rodziców [111]. Jednak biorąc pod uwagę, iż propolis przeżywał

największą popularność w latach 70 i 80 to raczej jednym z powodów wzrostu uczuleń u dzieci może być fakt wzrostu zachorowalności na AZS i choć przyczyna choroby nie jest znana to jednak istotny wpływ mają czynniki środowiskowe takie jak zanieczyszczenie środowiska. W krajach wysoko rozwiniętych około 30% populacji ma dolegliwości alergiczne, a dodatkowo mieszkańcy miast częściej zapadają na choroby alergiczne niż mieszkańcy regionów rolniczych, czystszych ekologicznie.

W badaniu przeprowadzonym przez Czarnobilską i wsp. [111,112] u 103 dzieci w wieku od 7 do 8 lat oraz u 93 nastolatków w wieku od 16 do 17 lat wykazano znacznie większy odsetek dzieci uczulonych na propolis. W testach płatkowych na propolis 16,5% dzieci wykazało dodatni wynik, natomiast odsetek ten spadał znacznie u młodzieży i wynosił 5,4%, choć dalej utrzymywał się na poziomie wyższym niż u dorosłych. Autorzy tłumaczą wzrost uczuleń na propolis wśród dzieci wzrostem popularności tego surowca pszczelego i podkreślają istotność włączenia propolisu do standardowej serii testowanych alergenów (obecnie propolis jest składnikiem rozszerzonej Europejskiej Serii Podstawowej) jako jednego z częstszych alergenów u dzieci [111]. Propolis został uznany przez badaczy za jeden z najczęstszych kontaktowych alergenów u dzieci i młodzieży, natomiast te dane nie zostały potwierdzone u dorosłych, gdzie w badaniu przeprowadzonym w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi na 4433 pacjentach propolis nie znalazł się wśród 10 najczęstszych alergenów kontaktowych [113].

1.4. Działanie drażniące

Badania wykonane przez Czarneckiego [114] wykazały, że etanolowy ekstrakt z propolisu (EEP) zastosowany w postaci 3% kremu na wydepilowaną skórę świnki morskiej nie wywiera działania pierwotnie drażniącego. Badania wykonane na królikach także nie wykazały działania pierwotnie drażniącego EEP na skórę [115].

Natomiast Kędzia i wsp. [116] obserwowali aktywność przeciwzapalną 10% EEP w karageninowym obrzęku łapy szczura w 7 na 9 przypadków. W pozostałych dwóch obserwowano wzrost obrzęku łapy szczura, co zdaniem autorów może świadczyć o pierwotnym działaniu drażniącym EEP.

Również Ledon i wsp. [117] badali pierwotne działanie drażniące EEP na skórę świnek morskich oraz błonę śluzową oka królików. Badania wykazały, że 50% roztwór EEP w 70% etanolu nie wykazywał działania na nieuszkodzoną skórę świnek morskich, natomiast w przypadku uszkodzonej skóry u wszystkich zwierząt powodował pierwotne działanie drażniące. Podobnie działał na błonę śluzową oka królików. W przypadku niepodrażnionych

oczu działania drażniącego nie wykazano, jednak, gdy nakładano go na podrażnioną mechanicznie błonę śluzową oka działał drażniąco.

2. Cel i założenia pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena rozpowszechnienia nadwrażliwości kontaktowej na propolis wśród pszczelarzy i ich rodzin oraz ocena potencjału alergizującego propolisu u zwierząt doświadczalnych.

Uzasadnienie celowości podjętych badań

Propolis (kit pszczeli) to mieszanina substancji żywicznych zebranych przez pszczoły z pączków i młodych pędów topoli, brzozy, świerku, kasztanowca i innych drzew oraz krzewów. Propolis jest używany przez pszczoły do pokrywania nim wszelkich elementów wewnętrznych ula, wypełniania nieszczelności i zabezpieczania wlotu ula przed wtargnięciem drobnoustrojów zagrażających ich zdrowiu i życiu oraz do balsamowania intruzów, którym udało się wtargnąć do ula. Pszczoły wykorzystują właściwości bakteriobójcze, przeciwgrzybicze, przeciwpierwotniakowe i przeciwwirusowe propolisu. Te właściwości farmakologiczne propolisu są od lat wykorzystywane w leczeniu. gdzie propolis jest stosowany jako środek dezynfekujący rany, bakteriobójczy, przeciwwirusowy, przeciwgrzybiczy, przeciwpierwotniakowy, miejscowo-znieczulający, przeciwzapalny, przyspieszający procesy gojenia i regeneracji tkanek, immunostymulujący i cytoprotekcyjny.

Mimo szeregu korzystnych właściwości farmakologicznych propolisu zdarza się, że po zastosowaniu na skórę może dojść do alergii kontaktowej. Z przeglądu piśmiennictwa wynika, że alergia na propolis u ludzi z chorobami dermatologicznymi występuje znacznie częściej niż u ludzi zdrowych, a szczególnie narażeni na propolis są pszczelarze, u których zmiany skórne mają charakter zawodowy [14,15,16]. Ocena rozpowszechnienia alergii na propolis u ludzi, jak i pszczelarzy, budzi jednak ciągle kontrowersje. Według Rudzkiego 1/4 uczulonych na propolis to pszczelarze, natomiast inni autorzy [16,17,89,90] twierdzą, że alergię na propolis ma od 0,76 - 4,04% pszczelarzy. Jeszcze bardziej dyskusyjne są wyniki badania potencjału alergizującego na zwierzętach doświadczalnych pozwalające zaliczyć propolis do bardzo silnych alergenów. W niektórych ośrodkach działanie alergizujące propolisu jest nawet porównywalne z dinitrochlorobenzenem (DNCB). Tak negatywna opinia rodzi obawy u pszczelarzy przed bezpośrednim kontaktem z propolisem w pasiece, jak i w licznej populacji przed stosowaniem dostępnych na rynku produktów z propolisem, co często jest przyczyną zmniejszenia zainteresowania tymi produktami.

Rozbieżności w piśmiennictwie na temat rozpowszechnienia alergii na propolis u ludzi, jak również wykazane silne działanie alergizujące u świnek morskich w pełni uzasadniają podjęte badania.

Prowadzone w pracy badania objęły:

1. Pozyskanie danych w badaniu kwestionariuszowym od pszczelarzy jako grupy zawodowej najbardziej narażonej na kontakt z propolisem, w tym informacji na temat:

- zależności między uczuleniami na propolis a innymi produktami pszczelimi,
- zależności między uczuleniami na propolis a innymi alergenami,
- zależności między uczuleniami na propolis a niektórymi chorobami o podłożu alergicznym,
- nasilenia wystąpienia alergii na propolis oraz powszechności tego zjawiska u tej grupy zawodowej,
- ciężkości występujących działań niepożądanych.

2. Wykonanie testu maksymalizacji świnki morskiej (GPMT) w celu:

- wykazania czy propolis jest silnym, umiarkowanym bądź słabym alergenem,
- porównania wyników testu dla propolisu oraz balsamu peruwiańskiego,
- porównanie wyników otrzymanych najnowszą metodą zgodnie z wytyczną OECD Guideline for testing of chemicals - Skin sensitisation z wynikami Petersena z 1977 roku otrzymanymi według starej metody dającej fałszywie pozytywne wyniki,
- oceny wpływu propolisu na wyniki badań histopatologicznych wycinków skóry świnek morskich.

Praca doktorska obok wartości naukowej obejmującej ocenę potencjału alergizującego propolisu posiada także wartość praktyczną dotyczącą dalszego znaczenia preparatów z propolisem w terapii, w tym potencjalnego wycofania, konieczności dopisania przeciwwskazań lub ostrzeżeń na ulotkach i etykietach.

3. Metodyka badań

3.1. Badanie kwestionariuszowe wśród pszczelarzy

Badanie przeprowadzone zostało w Katedrze Farmakodynamiki Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego *Collegium Medicum* za pomocą kwestionariusza dotyczącego uczuleń na produkty pszczele w grupach podwyższonego ryzyka, jakimi są pszczelarze oraz ich rodziny. Kwestionariusz osobowy pod tytułem „*Alergia na propolis wśród pszczelarzy*” ułożono w oparciu o wcześniejsze doniesienia na temat alergii na propolis u pszczelarzy oraz u ogólnej populacji. Kwestionariusz przetestowano na 20 ochotnikach dla zbadania czytelność ankiety. Ankiety trafiały do pszczelarzy za pośrednictwem Związku Pszczelarskiego, a w szczególności Wojewódzkiego Związku Pszczelarzy w Krakowie. Badanie wykonano na osobach dorosłych obojga płci, po wyrażeniu zgody na wzięcie udziału w badaniu. Kryterium włączenia było wykonywanie zawodu pszczelarza (amatorsko bądź zawodowo). Do wyliczeń statystycznych użyto programu *Statistica*. Badanie zgłoszono do Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Zgodę na przeprowadzenie badania otrzymano 25 listopada 2010 roku - numer zgody KBET/211/B/2010. W Tabeli 2 przedstawiono kwestionariusz wysłany do pszczelarzy dotyczący propolisu.

Tabela 2. Kwestionariusz osobowy wysłany do pszczelarzy

Uczulenie na propolis – pszczelarze

1. Czy wystąpiły w przeszłości u Pana/Pani alergię?

1.1 Jeżeli wystąpiły to bardzo proszę podać na jakie alergeny (np. substancje, leki, zwierzęta, roztocza kurzu, pyłki traw i drzew, rodzaj żywności) jest Pan/Pani uczulony/a?

2. Czy choruje Pan/Pani na: a. atopowe zapalenie skóry b. astmę c. alergiczny nieżyt nosa (katar sienny) d. wysypki skórne e. inne choroby o podłożu alergicznym f. żadne z powyższych

2.1 Czy w związku z chorobą stosuje Pan/i leczenie?

2.2 Jakie leki przeciwalergiczne stosowano lub jakie leki stosuje Pan/i obecnie?

3. Czy stosuje Pan/Pani leki systematycznie (np. w przebiegu nadciśnienia, cukrzycy, miażdżycy i innych chorób)?

3.1 Jeśli tak to proszę podać jakie?

3.2 Czy zauważył/a Pan/Pani zmianę intensywności reakcji na propolis przy równoczesnym zażywaniu leków?

4. Czy wystąpiły u Pani/Pana działania uboczne po kontakcie (przy zbiorze i ewentualnej obróbce) z propolisem?

4.1 Jeśli tak to czy były one: a. bardzo nasilone b. nasilone c. umiarkowane d. niewielkie

5. Czy Pan/Pani stosował/a preparaty propolisowe w celach prozdrowotnych?

5.1 Jeśli tak to czy wystąpiły działania niepożądane

5.2 Jeżeli wystąpiły działania niepożądane to czy były one: a. bardzo nasilone
b. nasilone c. umiarkowane d. niewielkie

5.3 Czy wystąpiły następujące objawy niepożądane: a. swędzenie b. wyprysk (wysypka) c. opuchlizna d. zaczerwienienie e. inne (proszę podać jakie) ...

5.4 Czy działania niepożądane wymagały: a. hospitalizacji b. wizyty u lekarza pierwszego kontaktu c. wizyty u dermatologa d. wystarczyło odstawić stosowanie propolisu

5.5 Czy z biegiem czasu objawy alergii na propolis? a. utrzymywały się b. zaostrzały się c. zmniejszały

6. Czy (oprócz ewentualnego uczulenia na propolis) stwierdzono u Pana/i uczulenie na inne produkty pszczele? Jakiej objawy?

Uczulenia na propolis u członków rodziny, sąsiadów, znajomych, klientów etc.

1a. Jakiej ma Pan/i doświadczenie odnośnie wartości prozdrowotnych propolisu?
a. brak doświadczeń b. bardzo złe doświadczenia c. złe doświadczenia
d. ani dobre ani złe e. dobre doświadczenia f. bardzo dobre doświadczenia

2a. Czy poleca Pan/Pani propolis w celach prozdrowotnych?

3a. Czy posiada Pan/Pani informacje o wystąpieniu alergii na propolis u klientów, którzy kupili u Pana/Pani propolis na własny użytek? Jeśli tak to proszę podać u ilu osób i po jakim stosowaniu (doustnym, na skórę itp.), jeżeli posiada Pan/Pani takie informacje.

4a. Czy wystąpiły działania uboczne po kontakcie z propolisem u osób z rodziny, które pomagają lub pracują przy zbiorze propolisu (lub ewentualnej obróbce)?

4.1a Jeśli tak to czy były one: a. bardzo nasilone b. nasilone c. umiarkowane
d. niewielkie

5a. Ile osób z rodziny stosowało propolis w celach prozdrowotnych lub profilaktycznych?

6a. Czy skarżyli się na jakiejś działania uboczne po zastosowaniu preparatów profilaktycznych z propolisem (swędzenie, wysypka, opuchlizna, alergia, inne)?

6.1a Czy działania niepożądane u osób z rodziny były: a. bardzo nasilone b. nasilone
c. umiarkowane d. niewielkie

6.2a Czy działania niepożądane wymagały: a. hospitalizacji b. wizyty u lekarza pierwszego kontaktu c. wizyty u dermatologa d. wystarczyło odstawić stosowanie preparat

6.3a Proszę wymienić jakie działania niepożądane wystąpiły u członków rodziny:
a. świąd b. wysypka c. opuchlizna d. pęknięcie skóry e. inne (proszę podać jaki) ...

6.4a Czy osoba u której wystąpiły działania uboczne jest alergikiem?

3.2. Ocena działania alergizującego propolisu w teście maksymalizacji świnki morskiej (GPMT)

Miejscowe zaczerwienienia i obrzęk skóry można wywołać u różnych gatunków zwierząt, przy czym odczyny skórne na histaminę najlepiej wywołać u świnki morskiej.

Badanie zgłoszono do I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie i uzyskano zgodę na przeprowadzenie badania (Uchwała nr 142/2012 z dnia 17 października 2012 roku).

Badanie przeprowadzono na zdrowych osobnikach płci męskiej o wadze od 260 do 530 g. Zwierzęta aklimatyzowano do warunków laboratoryjnych przez 7 dni przed rozpoczęciem testu. Świnki przetrzymywano w pokoju o stałej temperaturze 22°C oraz wilgotności 50%, przy sztucznym oświetleniu (12 h światło, 12 h ciemności). Zwierzęta karmiono i poiono wodą z dodatkiem kwasu askorbinowego *ad libitum*. Przed rozpoczęciem badania zwierzęta ważono i losowo przydzielono do odpowiednich grup. Do grupy badanej z propolisem zakwalifikowano 11 osobników, w grupie badanej z balsamem peruwiańskim znalazło się 12 zwierząt, a w grupie kontrolnej 6. Początkowo w grupie z propolisem znajdowało się 12 zwierząt, niemniej jednak ze względu na stan zdrowia jednego z nich zostało ono wykluczone z badania, przed rozpoczęciem testu.

Odczynniki takie jak balsam peruwiański oraz kompletny odczynnik Freund'a (FCA) nabyto od firmy Sigma-Aldrich. Ekstrakt etanolowy z propolisu (EEP) otrzymano od Przedsiębiorstwa Pszczelarsko-Farmaceutycznego Apipol-Farma Sp. z o.o. Jego jakość jest zgodna z Polską Normą PN-A-77627: 1996 koncentrat propolisowy.

Test przeprowadzono metodą: testem maksymalizacji świnki morskiej (GPMT) zgodnie z wytyczną *OECD Guideline for testing of chemicals - Skin sensitisation*. Podczas ekspozycji indukcyjnej stężenie etanolowego ekstraktu z propolisu wynosiło 20%, jak również balsamu peruwiańskiego 20%. Stężenia te zgodnie z wytyczną OECD są systematycznie dobrze tolerowane oraz najwyższe, które mogą powodować od słabego do umiarkowanego podrażnienia skóry. Podczas ekspozycji prowokacyjnej zastosowano etanolowy ekstrakt z propolis oraz balsam peruwiański w stężeniu 5%, czyli w najwyższym stężeniu niedrażniącym.

W dniu 0 grupie badanej wstrzykiwano śródskórnie w objętości 0,1 ml:

- a. odczynnik Freund'a (Freund's Complete Adjuvant – FCA) rozpuszczony w wodzie do iniekcji,

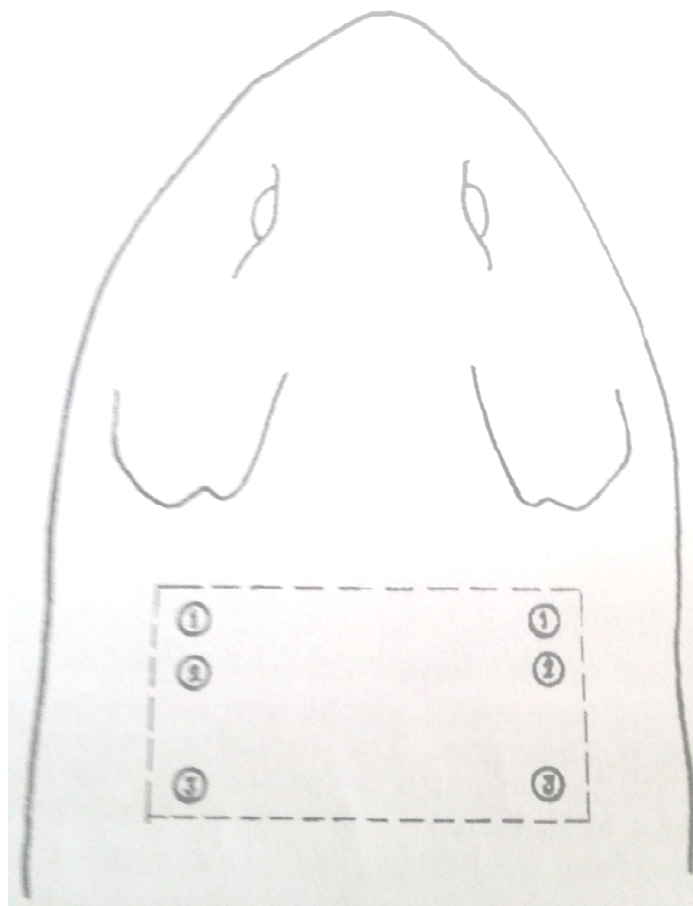
- b. propolis lub balsam peruwiański w etanolu w stężeniu 20%,
- c. testowaną substancję (odpowiednio propolis lub balsam peruwiański) w mieszaninie (1:1 v/v) z odczynnikiem Freunda rozpuszczone w wodzie do iniekcji.

W dniu 0 grupa kontrolna otrzymała śródskórną w objętości 0,1 ml:

- a. mieszaninę (1:1 v/v) odczynnika Freunda w wodzie do iniekcji,
- b. nierozcieńczony nośnik - etanol
- c. 50% w/v mieszaninę nośnika - etanolu z (1:1 v/v) odczynnikiem Freunda w wodzie do iniekcji.

Rozmieszczenie poszczególnych iniekcji na grzbiecie świnki morskiej przedstawiono na Rycinie 1.

Rycina 1. Umieszczenie poszczególnych iniekcji śródskórnych na grzbiecie świnki podczas ekspozycji indukcyjnej.



1 - odczynnik Freund'a rozpuszczony w wodzie do iniekcji

2 - testowana substancja rozpuszczona w odpowiednim nośniku lub sam nierozcieńczony nośnik

3 - testowana substancja w mieszaninie z odczynnikiem Freund'a rozpuszczonym w wodzie do iniekcji lub nośnik w mieszaninie z odczynnikiem Freund'a rozpuszczonym w wodzie do iniekcji

W 7 dniu grupie badanej nakładano nasączone propolisem lub balsamem peruwiańskim płatki gazy. Kontakt ze skórą utrzymywano przez 48 godzin za pomocą szczelnego opatrunku.

W 7 dniu grupie kontrolnej nakładano sam nośnik za pomocą nasączonych płatków gazy i utrzymywano kontakt ze skórą przez 48 godzin za pomocą szczelnego opatrunku.

W 21 dniu wywoływano miejscowy odczyn alergiczny. Zwierzętom z obu grup usuwano sierść. Plaster z badaną substancją nakładano na jeden bok świnki, a na drugi bok aplikowano plaster z nośnikiem. Kontakt ze skórą utrzymywano przez 24 godziny za pomocą szczelnego opatrunku.

Po 48 godzinach po zastosowaniu dawki wywołującej oceniano reakcję według skali Magnussona i Kligmana (I obserwacja).

Poniżej zamieszczono skalę:

0 - brak widocznych zmian

1 - łagodny lub plamkowy rumień

2 - umiarkowany lub zlewający się rumień

3 - silny rumień i obrzęk.

Ponownie po 24 godzinach (72 godziny po fazie wywoływania odczynu) obserwację powtarzano (II obserwacja). Po zakończonym teście zwierzęta ponownie ważono. Waga świnek wahała się od 362 do 594 g.

3.3. Badania histopatologiczne, leukogram oraz oznaczenie poziomu interferonu gamma

Świnkom pobrano krew do dalszych oznaczeń za pomocą systemu do pobierania krwi S-Monovette(R) z antykoagulantem - solą potasową EDTA. Wykonano rozmazy krwi za pomocą barwienia metodą May–Grünwalda Giemzy. Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono przy powiększeniu obiektywu 100x. Odsetek poszczególnych populacji leukocytów badano w rozmazie krwi i liczono je trzykrotnie za pomocą analizatora hematologicznego.

Wykonano również oznaczenie poziomu interferonu gamma. Pobraną krew odwirowano w ciągu 10 minut przy 3000 obrotach/minutę, a supernatant zlano do probówek i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczenia za pomocą metody ELISA zestawem IFN gamma PIG ELISA kit firmy ABCAM.

Zwierzęta po eksperymencie uśmiercono i pobierano wycinki skóry z miejsca nakładania substancji do badań histopatologicznych. Wycinki skóry poddano rutynowej procedurze histologicznej wykonanej w Zakładzie Cytobiologii Katedry Farmakobiologii. Natychmiast po pobraniu utrwalano je w utrwalaczu histologicznym AFA, a następnie rutynowo zatapiano w parafinie i skrawano na skrawki o grubości 6-9 µm.

Do oceny histopatologicznej wykonano następujące barwienia:

- barwienie hematoksyliną i eozyną;
- barwienie trójchromatyczne według Massona – Goldnera. Metoda ta wykorzystuje żelazistą hematoksylinę Weigerta, azofloksynę, oranż G i zieleń świetlistą w celu zróżnicowania elementów tkanki łącznej i włókien mięśniowych.
- barwienie metodą May–Grünwalda Giemzy w celu uwidocznienia komórek bazofilnych (fioletowo zabarwione z licznymi ziarnistościami – mastocyty) oraz eozynofilnych (czerwone zabarwienie cytoplazmy). Granulocyty takie jak bazofile czy eozynofile podobnie jak neutrofile wykazują zdolność do fagocytozy, chemotaksji i migracji. Liczba tych komórek znacznie wzrasta szczególnie podczas reakcji uczuleniowych.

Obserwacje mikroskopowe przeprowadzono przy powiększeniu obiektywu 20x, 40x i 100x. Dokumentacja obrazów mikroskopowych wykonana została w oparciu o mikroskop świetlny Olympus BX-41, sprzężony kamerą z komputerowym programem analizy obrazów Cell-D.

4. Wyniki

4.1. Analiza ankiet uzyskanych od pszczelarzy

Wysłano 2540 ankiet, w tym 1360 ankiet w województwie małopolskim. Otrzymano 558 ankiet (21,97%), w tym 345 z województwa małopolskiego (25,4%), co nie świadczy o dużym zainteresowaniu alergiami zawodowymi wśród pszczelarzy oraz o chętniej współpracy pszczelarzy z badaczami. Charakterystykę demograficzną badanej grupy przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Charakterystyka demograficzna badanej grupy pszczelarzy

Cecha		Wynik
Wiek	Do 20 lat	0,40%
	21-40 lat	12,58%
	41-60 lat	45,84%
	Powyżej 60 lat	41,18%
Płeć	Kobiety	6,29%
	Mężczyźni	93,71%
Ilość lat pracy w pszczelarstwie	Do 5 lat	6,90%
	6-10 lat	15,01%
	11-15 lat	15,01%
	Powyżej 15 lat	63,08%
Liczba uli w gospodarstwie pasiecznym	Mediana	42,69

Uczulenie na propolis po kontakcie przy pracy w pasiece stwierdzono u 17 spośród 558 pszczelarzy (3,05%). Analizując częstotliwość występowania alergii w poszczególnych województwach stwierdzono, że najczęściej alergii u pszczelarzy odnotowano w województwie lubelskim. W Tabeli 4 przedstawiono przypadki alergii po kontakcie z propolisem przy pracy w pasiece z podziałem na województwa, które wyraziły chęć wzięcia udziału w badaniu i odesłały ankiety.

Tabela 4. Przypadki alergii kontaktowej na propolis w województwach biorących udział w badaniu

Województwo	Liczba ankiet nadesłanych	Przypadek alergii	% alergii
Małopolskie	345	12	3,48
Podlaskie	28	0	0
Wielkopolskie	65	0	0
Lubelskie	66	5	7,57
Dolnośląskie	14	0	0
Lubuskie	40	0	0

U dwóch spośród siedemnastu uczulonych pszczelarzy (11,76%) działania niepożądane po kontakcie z propolisem miały charakter bardzo nasilony, u sześciu (35,29%) umiarkowany, a u dziewięciu (52,94%) postać niewielkiego nasilenia, co zostało przedstawione na wykresie 1.

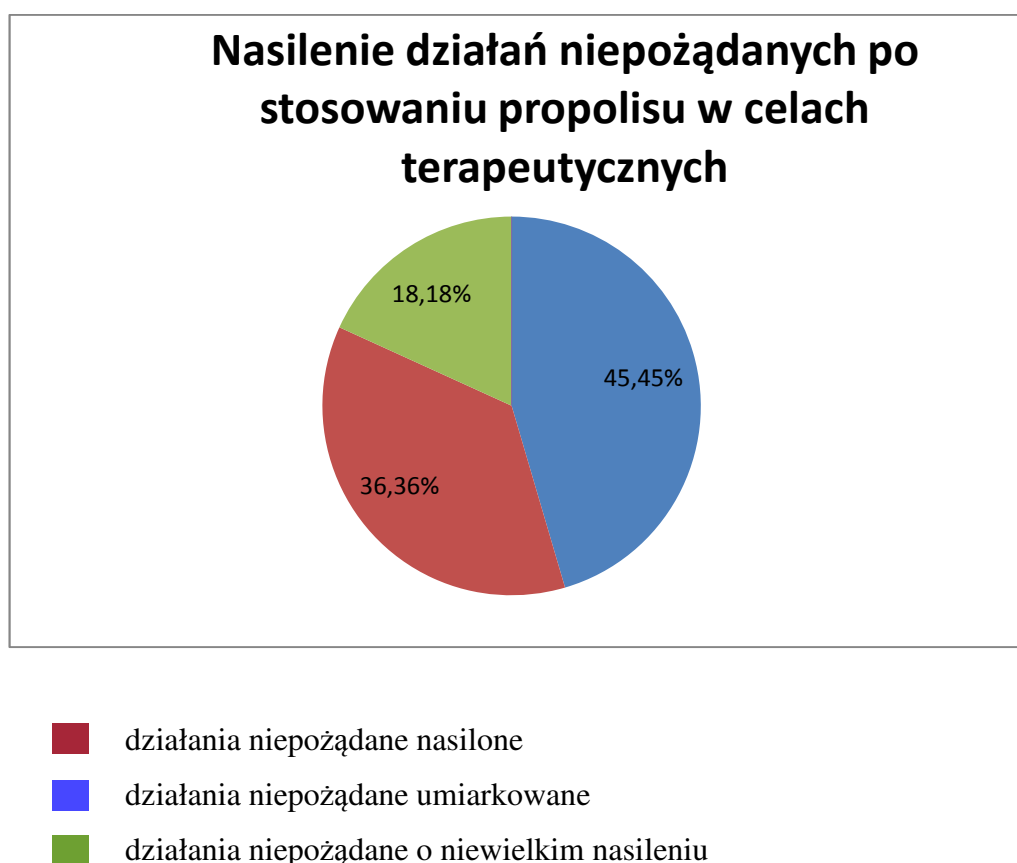
Wykres 1. Nasilenie działań niepożądanych po kontakcie z propolisem przy pracy w pasiece.



- działania niepożądane bardzo nasilone
- działania niepożądane umiarkowane
- działania niepożądane o niewielkim nasileniu

Dodatkowo 404 z 558 (72,40%) pszczelarzy stosowało propolis w celach prozdrowotnych. Z tej grupy u jedenastu (2,72%) wystąpiło uczulenie na propolis. U czterech pszczelarzy (36,36%) uczulenie miało charakter niewielkich działań niepożądanych, u pięciu (45,45%) umiarkowanych, a u dwóch zmiany były nasilone (18,18%), co zostało przedstawione na wykresie 2.

Wykres 2. Nasilenie działań niepożądanych po propolisie przy stosowaniu w celach terapeutycznych



U zdecydowanej większości (8 pszczelarzy = 72,72%) wystarczyło odstawić stosowanie propolisu, w dwóch przypadkach (18,18%) działania niepożądane wymagały wizyty u dermatologa, a u jednego pszczelarza (9,09%) wizyty u lekarza rodzinnego. 11 z 17 pszczelarzy uczulonych po kontakcie z propolisem przy pracy w pasiece stosowało dodatkowo propolis w celach prozdrowotnych w postaci roztworów, maści, nalewek i innych apiterapeutyków. Zaledwie u pięciu pszczelarzy wystąpiły jednocześnie działania niepożądane (jak: świąd, wysypka, opuchlizna, pęknięcie skóry) po kontakcie

z propolisem przy pracy w pasiece oraz po stosowaniu propolisu w celach prozdrowotnych w postaci preparatów doustnych oraz do stosowania miejscowego.

Nie było doniesień o równoczesnym uczuleniu na propolis i inne produkty pszczele, jak miód, jad pszczeli, pyłek kwiatowy czy mleczko pszczele. Ponadto pszczelarze podają, że u 14 osób spośród 2205 członków rodziny stosujących propolis w celach prozdrowotnych (0,63%) wystąpiły działania niepożądane po propolisie w postaci świądu, wysypki lub/ oraz obrzęku.

Tylko 11 z 558 (1,97%) pszczelarzy było uczulonych na inne produkty pszczele niż propolis. Trzech pszczelarzy było uczulonych na pyłek pszczeli (0,54%), dwóch na miód (0,36%) oraz siedmiu na jad pszczeli (1,42%). Wyniki badania uczulenia na inne produkty pszczele niż propolis przedstawia Tabela 5.

Tabela 5. Uczulenie na produkty pszczele z wyłączeniem propolisu u polskich pszczelarzy

Produkt pszczeli	Liczba pszczelarzy uczulonych	% pszczelarzy uczulonych (n=558)
Pyłek pszczeli	3	0,54%
Miód	2	0,36%
Mleczko pszczele	0	0%
Jad pszczeli	7	1,42%

Pszczelarze alergicy w grupie 558 osób stanowili 8,06% (45 osoby). Wśród tej grupy 13 było uczulonych na propolis. Oznacza to, iż na 17 pszczelarzy uczulonych na propolis, aż u 13 z nich (76,47%) wystąpiło uczulenie na inne alergeny. W grupie pszczelarzy alergików aż 28,9% było uczulonych na propolis. U zdrowej populacji pszczelarzy (niecierpiącej z powodu alergii) odsetek uczulonych na propolis wynosił zaledwie 0,97%, a zatem uczulenie na propolis występowało z pewnością częściej w grupie pszczelarzy alergików (test χ^2 z poprawką Pearsona: $p < 0,001$). Wyniki przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Uczulenie na propolis u pszczelarzy alergików i nie alergików

	Populacja	
	Pszczelarze alergicy	Pszczelarze nie alergicy
Ilość osób	45	513
Ilość osób uczulonych na propolis	13	5
Odsetek osób uczulonych na propolis	28,9%	0,97%

62 osoby donosiły, iż cierpią z powodu chorób o podłożu alergicznym (alergiczny nieżyt nosa, astma, atopowe zapalenie skóry, wysypki skórne, inne). Z tej grupy u 10 pszczelarzy (16,13%) wystąpiła alergia na propolis po kontakcie z tą substancją. Na czterech chorych z atopowym zapaleniem skóry, aż trzech było uczulonych na propolis (75%). Natomiast nie stwierdzono występowania alergii na propolis w grupie pszczelarzy astmatyków. W grupie pszczelarzy ze stwierdzonymi chorobami o podłożu alergicznym alergia na propolis występowała znamienne częściej, szczególnie u chorych ze stwierdzonym atopowym zapaleniem skóry (test χ^2 z poprawką Pearsona: $p < 0,001$). W Tabeli 7 przedstawiono szczegółowe dane na temat występowania chorób o podłożu alergicznym a alergią na propolis.

Tabela 7. Zależność pomiędzy występowaniem chorób o podłożu alergicznym a uczuleniem na propolis

Choroba alergiczna	Ilość pszczelarzy chorych	Ilość pszczelarzy uczulonych na propolis	Odsetek %
Atopowe zapalenie skóry	4	3	75,00
Astma	9	0	0
Alergiczny nieżyt nosa (katar sienny)	34	5	14,71
Wysypki skórne	10	2	20,00
Inne choroby o podłożu alergicznym	5	0	0

Pszczelarze w większości (405 osób = 72,58%) mieli dobre bądź bardzo dobre doświadczenie z propolisem odnośnie jego właściwości prozdrowotnych. O braku doświadczenia donosiły 114 osoby (20,43%) zajmujące się pszczelarstwem, natomiast zaledwie dziesięć osób (1,79%) donosiło o złym doświadczeniu oraz jedna osoba (0,18%) o bardzo złym doświadczeniu z propolisem. 28 osób (5,02%) nie miało ani dobrych ani złych doświadczeń z tym surowcem. Wyniki badania doświadczenia odnośnie wartości prozdrowotnych propolisu przedstawiono w Tabeli 8. Pomimo różnego doświadczenia z propolisem, aż 492 pszczelarzy (88,88%) polecało propolis swoim klientom, czyli znaczna większość. Wynika z tego, że nawet niektórzy pszczelarze z brakiem doświadczenia muszą polecać propolis swoim klientom. Może pytanie nie było do końca zrozumiałe albo rzeczywiście pszczelarze sprzedają propolis bez przekonania o jego własnościach prozdrowotnych.

Tabela 8. Doświadczenia odnośnie wartości prozdrowotnych propolisu zbieranego przez pszczoły u polskich pszczelarzy

Doświadczenie odnośnie właściwości prozdrowotnych propolisu	Liczba osób	Odsetek osób
Brak doświadczenia	114	20,43
Bardzo złe doświadczenie	1	0,18
Złe doświadczenie	10	1,79
Ani dobre ani złe	28	5,02
Dobre doświadczenie	195	34,95
Bardzo dobre doświadczenie	210	37,63

4.2. Działanie alergizujące w teście maksymalizacji świnki morskiej (GPMT)

Skóra świnek morskich w grupie z propolisem nie wykazała żadnych widocznych zmian w stosunku do grupy kontrolnej w czasie pierwszej i drugiej obserwacji (fot.1 - propolis, fot. 2 - kontrola).

Fot.1. Skóra świnki po podaniu propolisu - odczyt po 72 godzinach od zastosowania dawki wywołującej

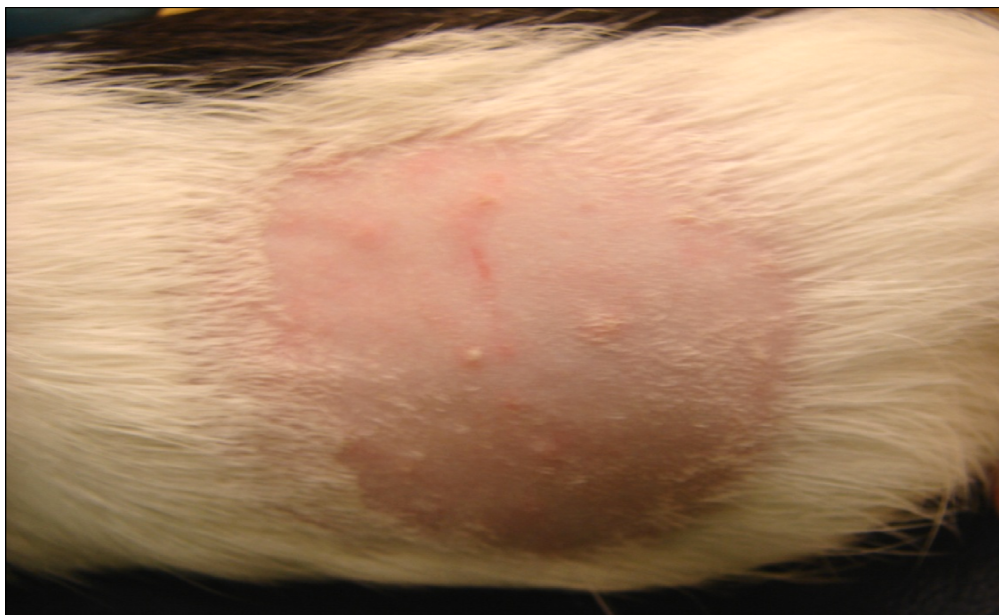


Fot.2. Skóra świnki po podaniu etanolu - odczyt po 72 godzinach od zastosowania dawki wywołującej



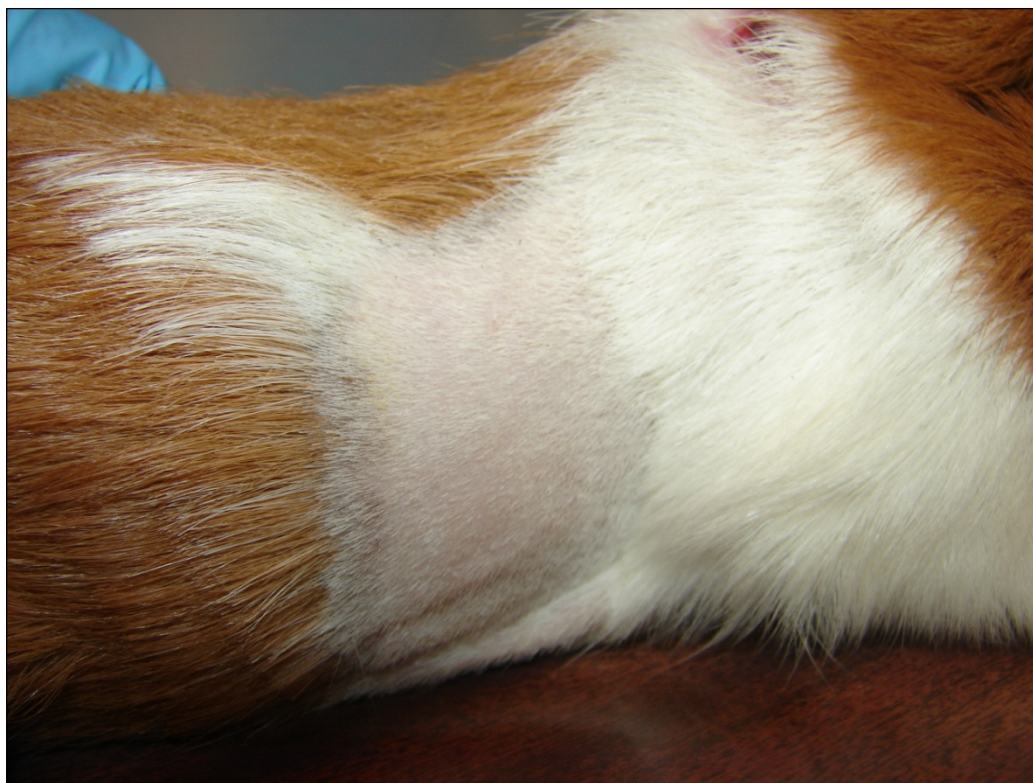
W grupie z balsamem peruwiańskim tylko w jednym przypadku wystąpił łagodny rumień podczas pierwszej obserwacji (1 według skali Magnussona i Kligmana - fot.3).

Fot.3. Skóra świnki z łagodnym rumieniem po podaniu balsamu peruwiańskiego - odczyt po 48 godzinach od zastosowania dawki wywołującej



Skóra pozostałych świnek morskich z grupy z balsamem peruwiańskim nie wykazała żadnych widocznych zmian w stosunku do grupy kontrolnej w pierwszej obserwacji (fot.4). Po drugiej obserwacji w każdym przypadku nie obserwowano widocznych zmian, które mogłyby wskazywać na wystąpienie odczynu alergicznego.

Fot.4. Skóra świnki po podaniu balsamu peruwiańskiego - odczyt po 72 godzinach od zastosowania dawki wywołującej



Wyniki eksperymentu przedstawiono w Tabeli 9.

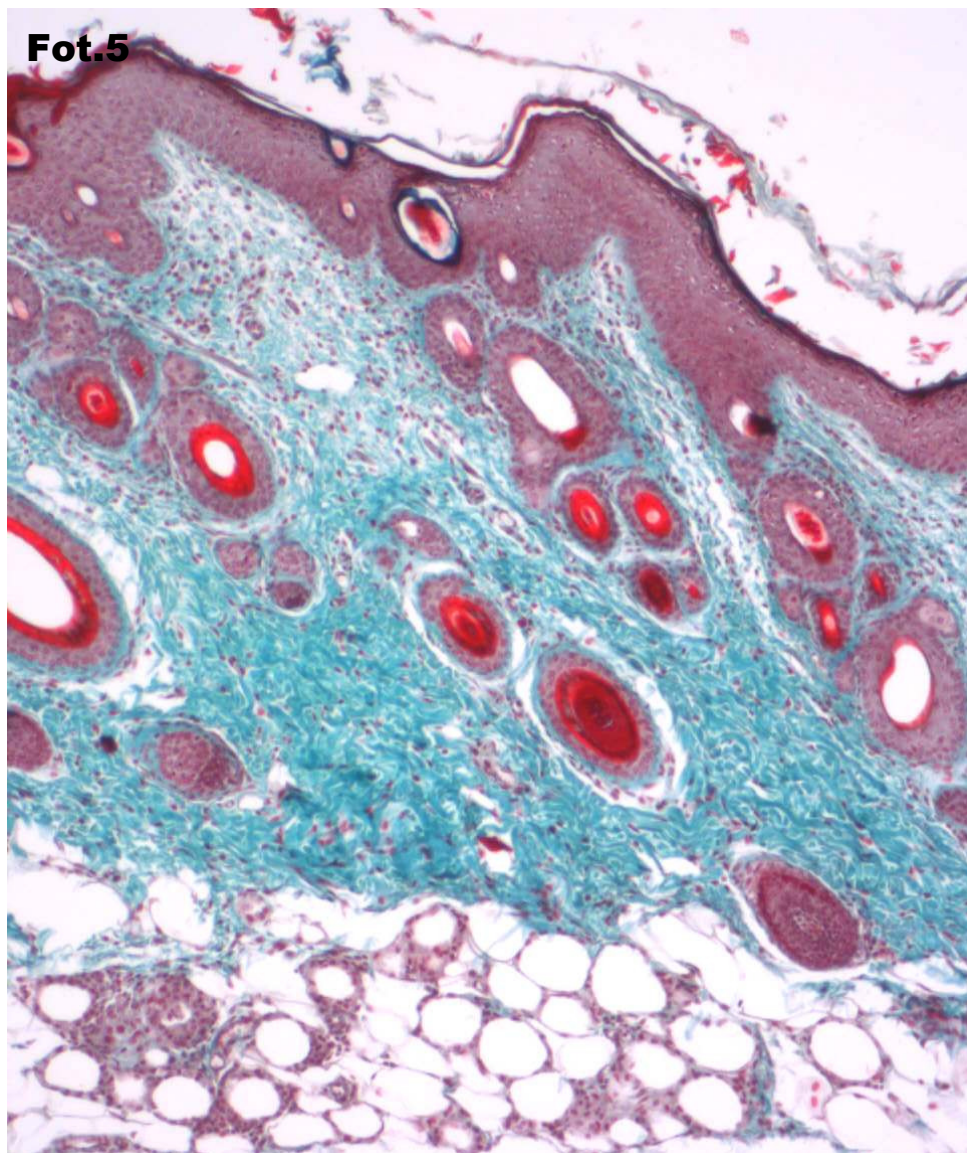
Tabela 9. Wyniki testu maksymalizacji świnki morskiej na grupie z propolisem oraz balsamem peruwiańskim w porównaniu z grupą kontrolną

Grupa badana	Obserwacja 1 (48 h po zastosowaniu dawki wywołującej)		Obserwacja 2 (72 h po zastosowaniu dawki wywołującej)	
	Liczba zwierząt z pozytywną reakcją	% zwierząt z pozytywną reakcją	Liczba zwierząt z pozytywną reakcją	% zwierząt z pozytywną reakcją
Propolis	0/11	0%	0/11	0%
Balsam peruwiański	1/12	8,33%	0/12	0%
Kontrola	0/6	0%	0/6	0%

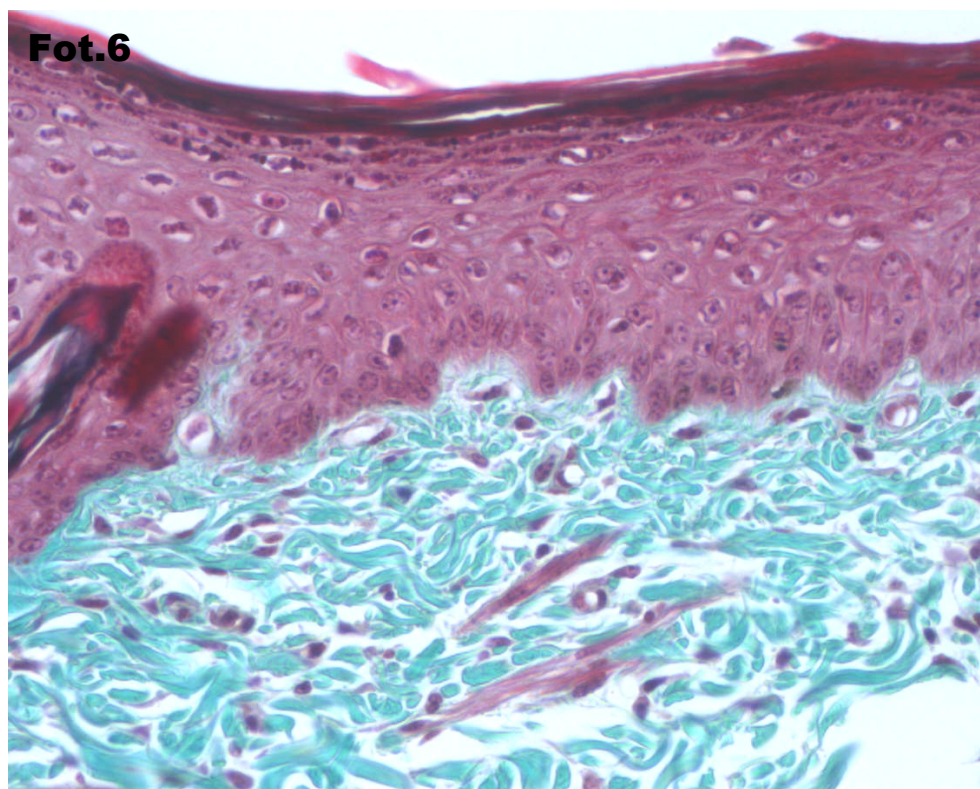
4.3. Wyniki badania histopatologicznego oraz wpływu na leukogram i oznaczenie poziomu interferonu gamma

Ocena makroskopowa pobranych fragmentów skóry nie wykazała żadnych zmian. Skóra była jasna, bez obrzęków, pęcherzy czy nadżerek. W obrazie histologicznym poszukiwano zmian charakterystycznych dla procesu zapalnego zachodzącego z udziałem wielu komórek układu immunologicznego typowych dla zapalenia alergicznego. Ostre zmiany charakteryzują się głównie śródskórnymi pęcherzykami, obrzękiem międzykomórkowym (spongioza) w obrębie naskórka oraz okołowłósczkowymi naciekami komórkowymi (limfocyty, eozynofile, mastocyty). Z kolei przewlekłe zmiany prowadzą do hiperplazji naskórka, nadmiernego rogowacenia i włóknienia obecnego we wszystkich warstwach skóry oraz do zwiększonej liczby komórek tucznych i komórek Langerhansa w skórze.

W badanych fragmentach skóry nie stwierdzono zmian typowych dla stanu zapalnego, a jedynie mobilizację granulocytów, głównie w obrębie skóry właściwej (fot 5 i 6).

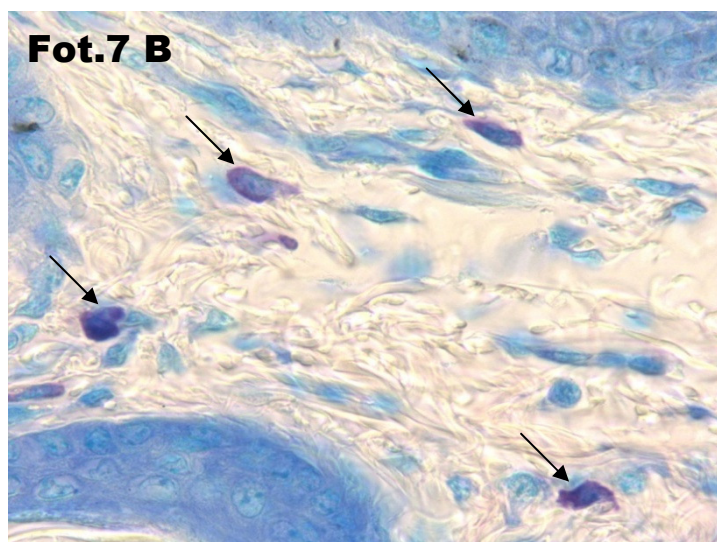
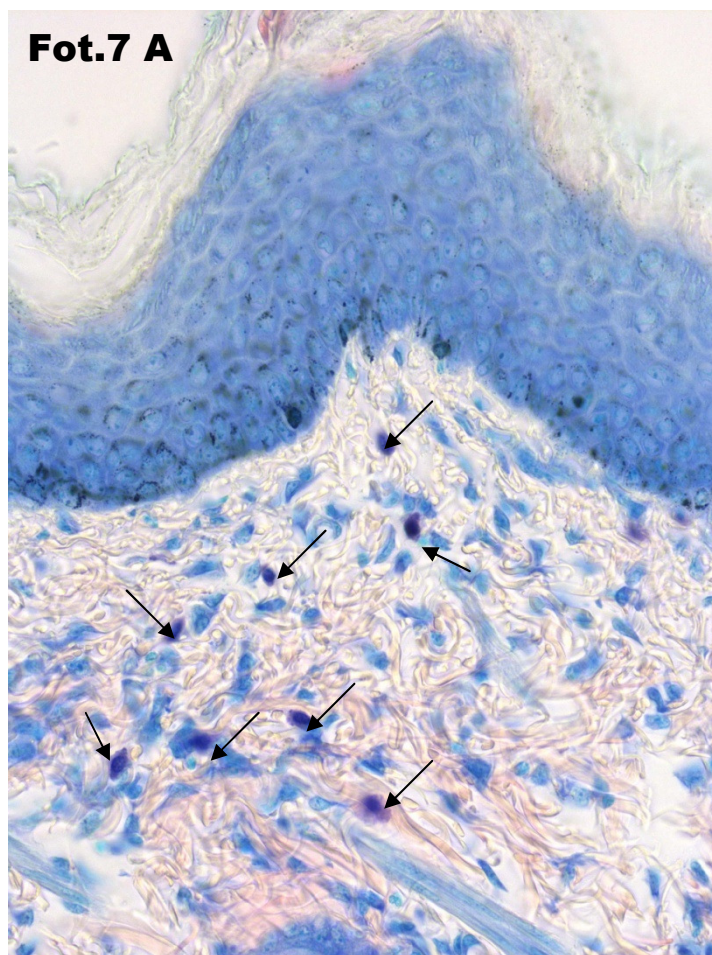


Fot.5. Przekrój podłużny przez skórę. Widoczne wszystkie warstwy: naskórek, skóra właściwa i tkanka podskórna. Barwienie metodą trójchromatyczną Masson`a. Powiększenie obiektywu 20x.

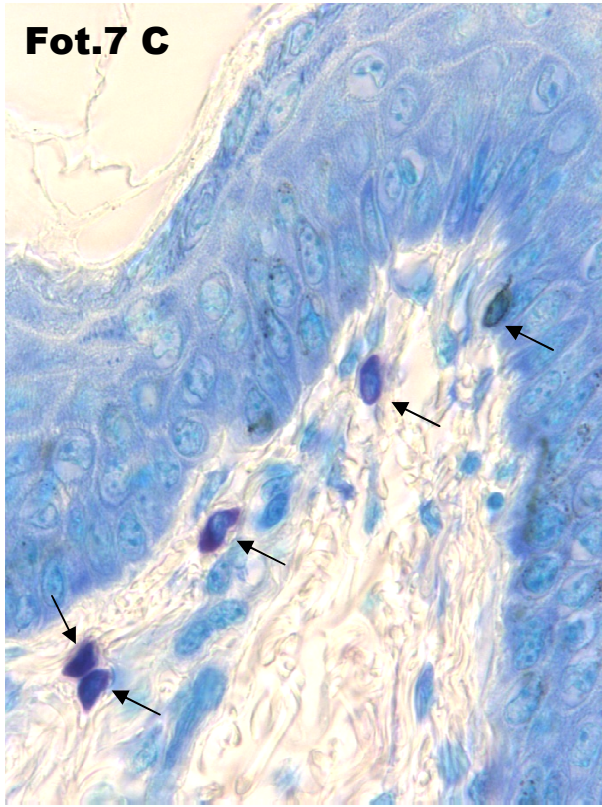


Fot.6. Przekrój podłużny przez skórę. Widoczny prawidłowo ukształtowany naskórek oraz fragment skóry właściwej. Barwienie metodą trójchromatyczną Masson`a. Powiększenie obiektywu 40x.

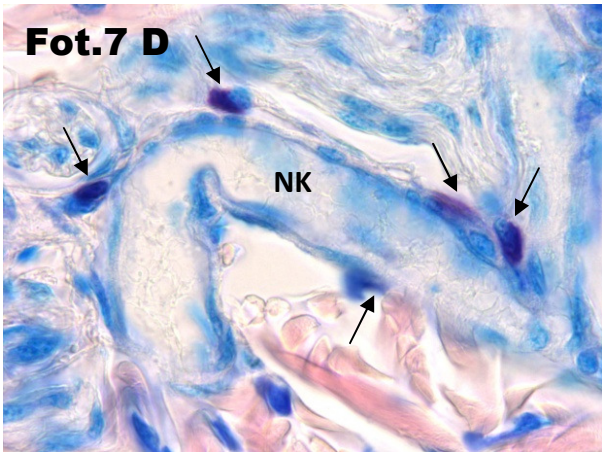
W jednym przypadku po podaniu propolisu (świnka numer 7) oraz w dwóch przypadkach po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 10 oraz 11, fot.7) można było zobaczyć bardzo liczne w polu widzenia mastocyty w obrębie skóry właściwej. Najwięcej było ich pod naskórkiem oraz wokół naczyń kapilarnych (fot.7D) i naczyń w głębszych warstwach skóry właściwej (fot.7E).

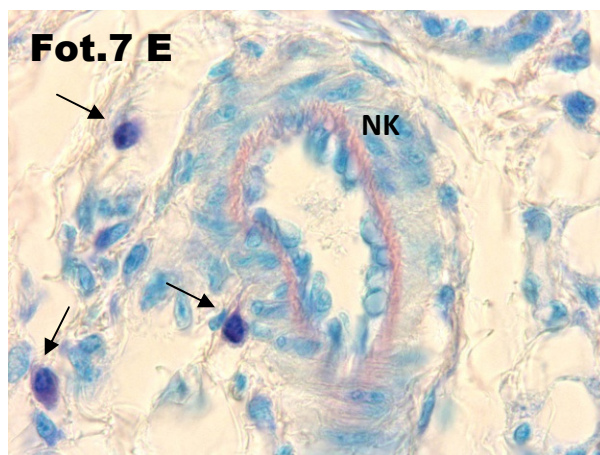


Fot.7 C



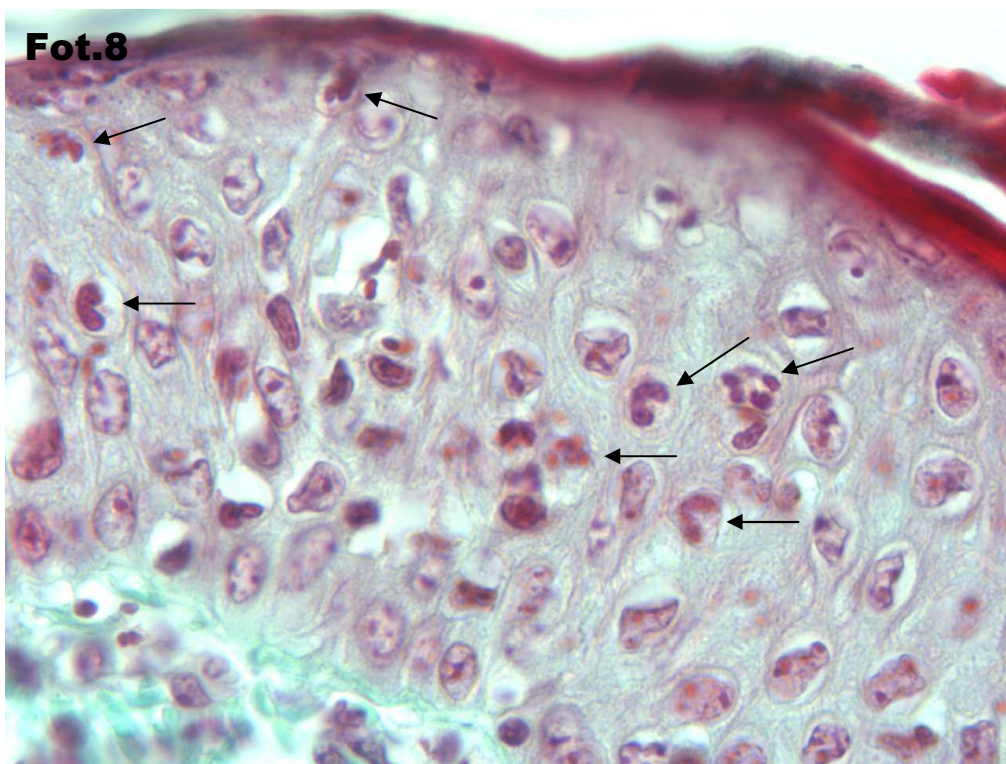
Fot.7 D





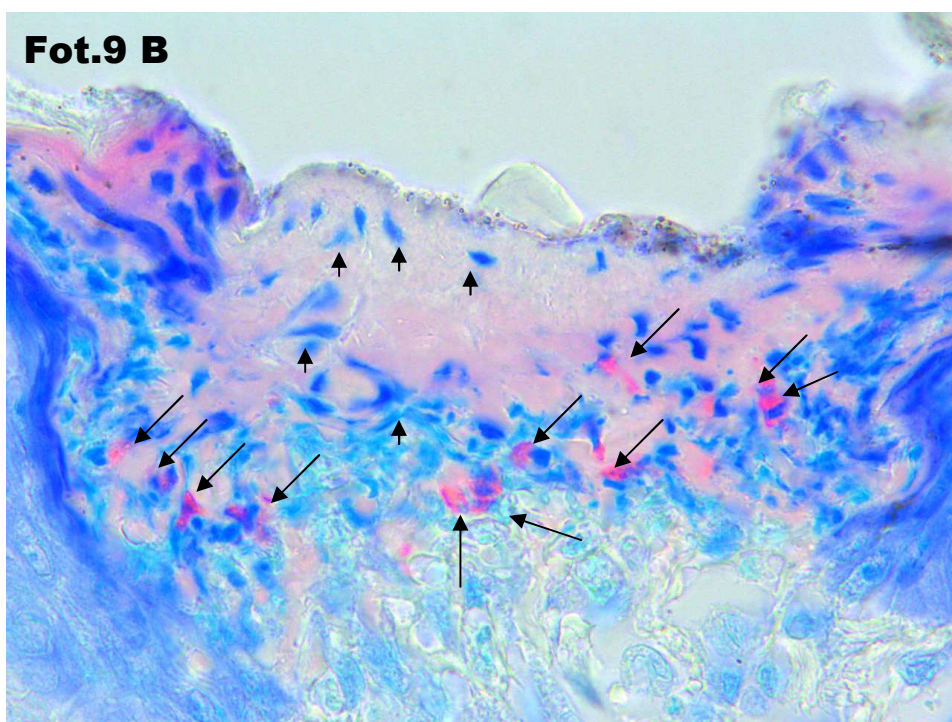
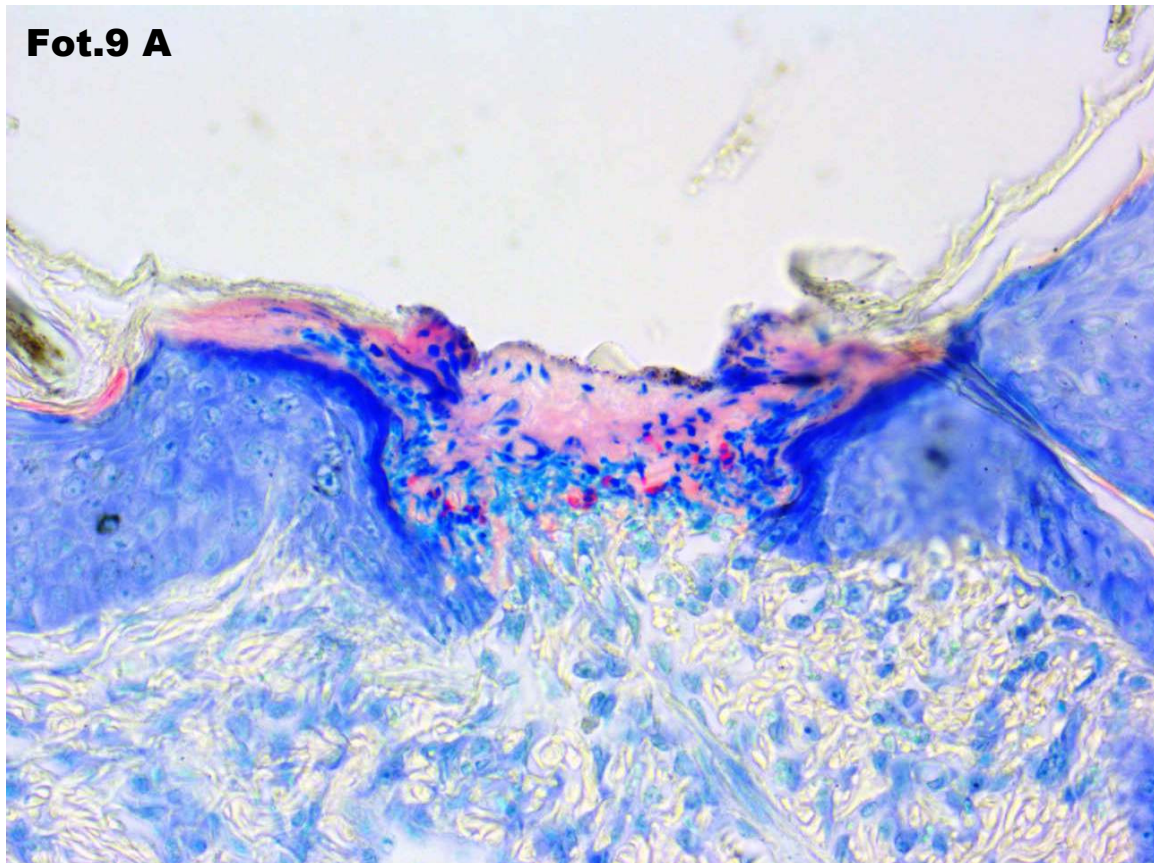
Fot.7. Fragment przekroju przez skórę świnki po podaniu propolisu (świnka numer 7) z licznymi mastocytami (↓) w skórze właściwej (fot. A, B, C) oraz w okolicy naczyń kapilarnych (NK) (fot. D, E). A - powiększenie obiektywu 40x; B, C, D, E - powiększenie obiektywu 100x; barwienie metodą May-Grunwalda Giemsy.

W pozostałych przypadkach granulocyty były nieliczne lub pojedyncze w polu widzenia. Tylko w jednym przypadku po podaniu propolisu (świnka numer 3) liczne neutrofile i monocyty infiltrowały naskórek (fot.8).



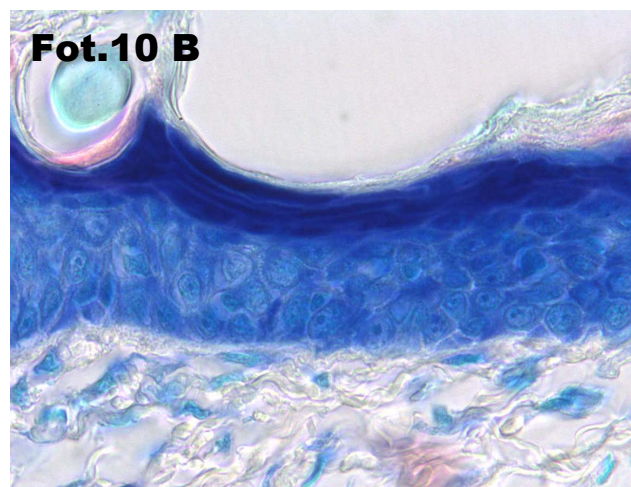
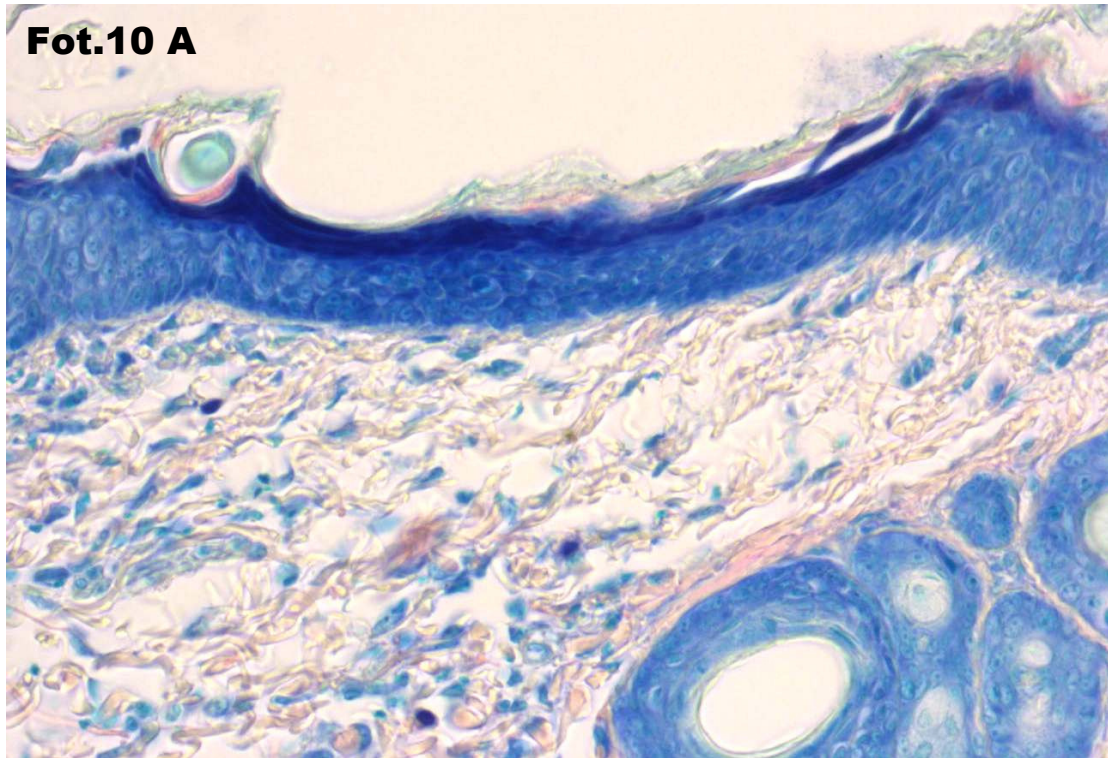
Fot.8. Przekrój podłużny przez naskórek. Widoczne liczne granulocyty (neutrofile) i monocyty infiltrujące warstwy naskórka. Barwienie metodą trójkromatyczną według Masson`a. Powiększenie obiektywu 100x.

W badanym materiale zwrócono również uwagę na uszkodzenia naskórka po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 3, fot.9) z widocznym naciekiem eozynofili.

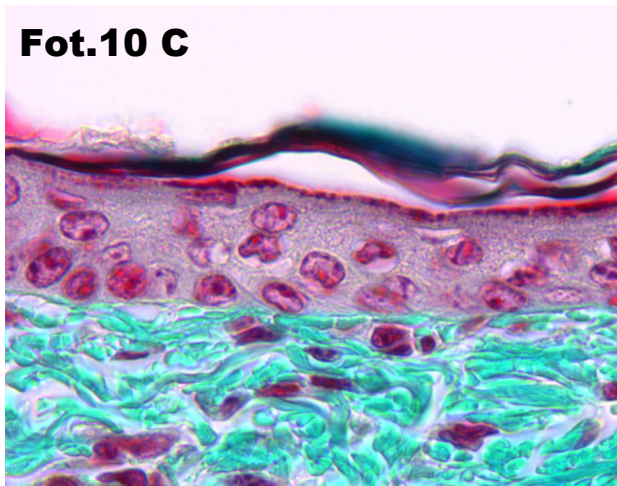


Fot.9. Fragment przekroju przez skórę świnki po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 3) z uszkodzonym naskórkiem. Widoczne wczesne etapy regeneracji naskórka z licznymi eozynofilami (↘) oraz z naciekającymi miofibroblastami (↗). Barwienie metodą May-Grunwalda Giemsa. A - Powiększenie obiektywu 40x, B - powiększenie obiektywu 100x.

Dodatkowo stwierdzono cienki, atypowy naskórek w jednym przypadku po podaniu propolisu (świnka numer 5, fot.10). Komórki kształtu kuboidalnego z pyknotycznymi jądrami, brak prawidłowej warstwy podstawnej.



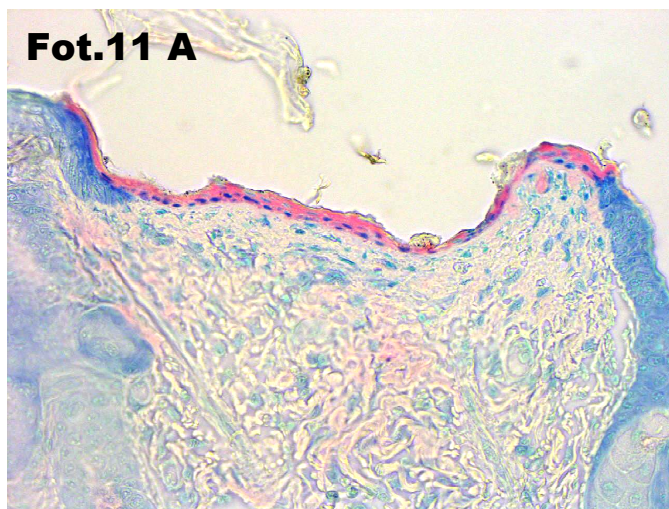
Fot.10 C

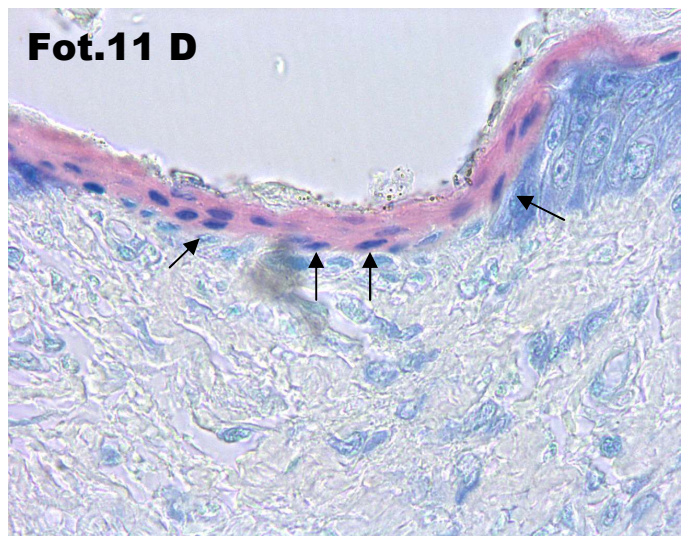
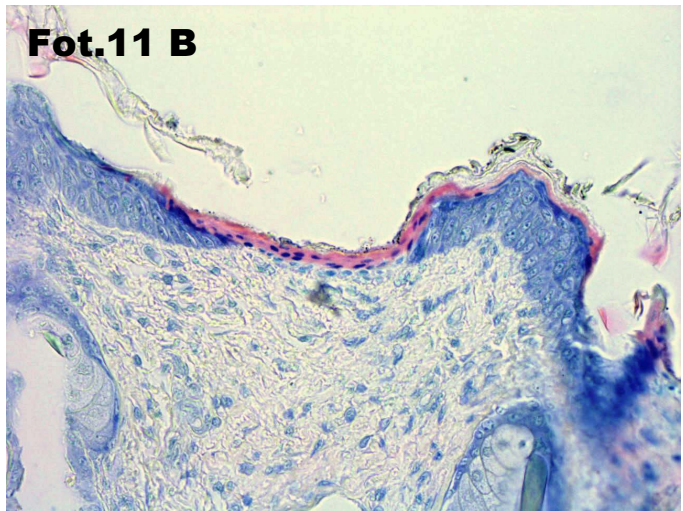


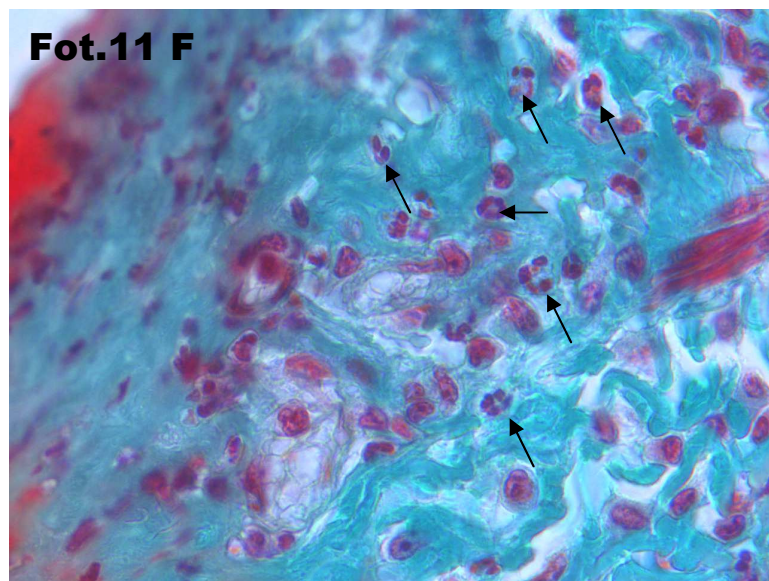
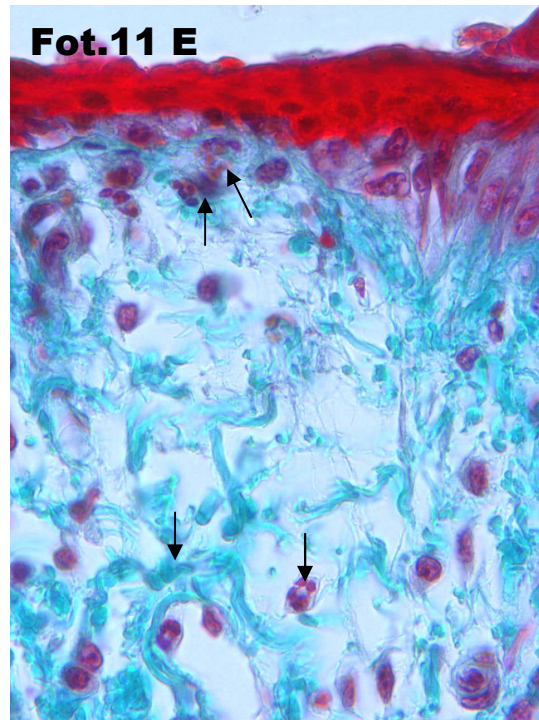
Fot.10. Fragment przekroju przez skórę świnki po podaniu propolisu (świnka numer 5) z atypowym naskórkiem. Naskórek jest stosunkowo cienki, widoczny brak zachowania typowego układu warstwowego, komórki są kształtu kuboidalnego z pyknotycznymi jądrami. Brak prawidłowej warstwy podstawnej. A. Barwienie metodą May-Grunwalda Giemsy, powiększenie obiektywu 40x. B - Barwienie metodą May-Grunwalda Giemsy, powiększenie obiektywu 100x. C - Barwienie metodą trójchromatyczną według Masson`a, powiększenie obiektywu 100x.

W dwóch przypadkach po podaniu balsamu peruwiańskiego zaobserwowano dużą powierzchnię regenerującego naskórka (świnka numer 5, fot.8 oraz świnka numer 12, fot.11) i obecność granulocytów w skórze właściwej.

Fot.11 A

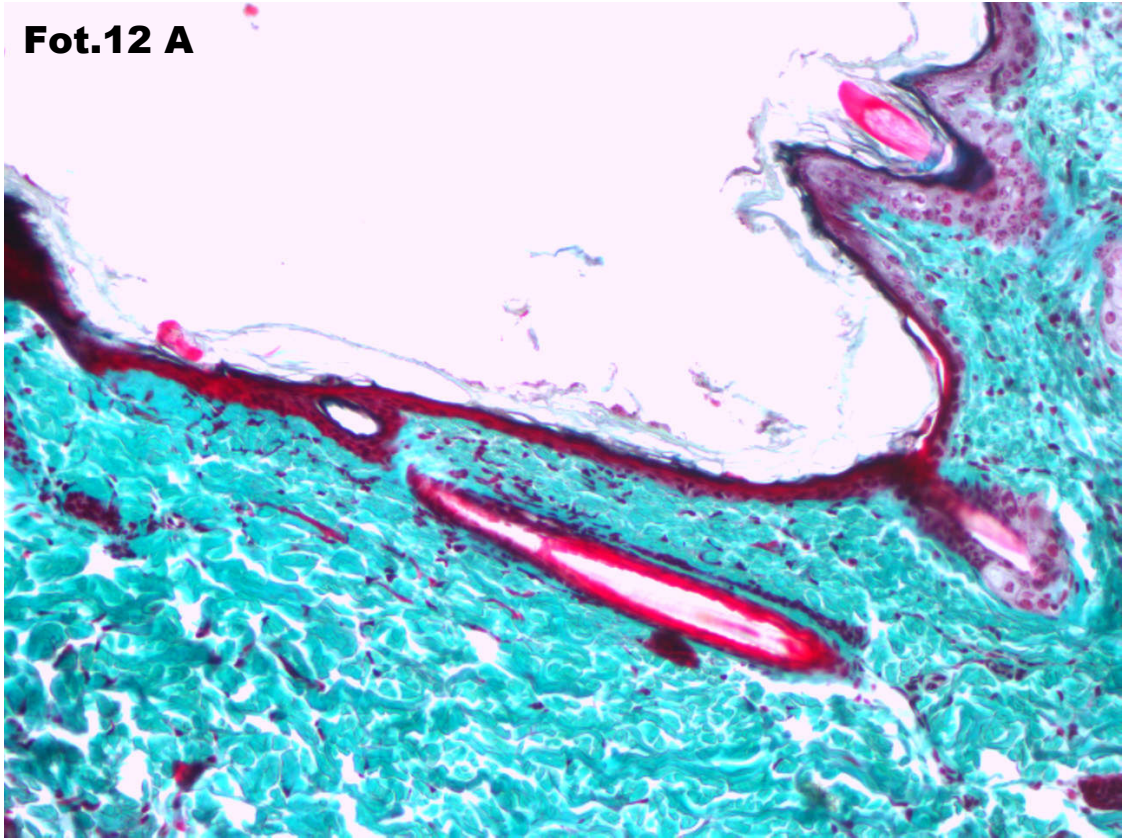




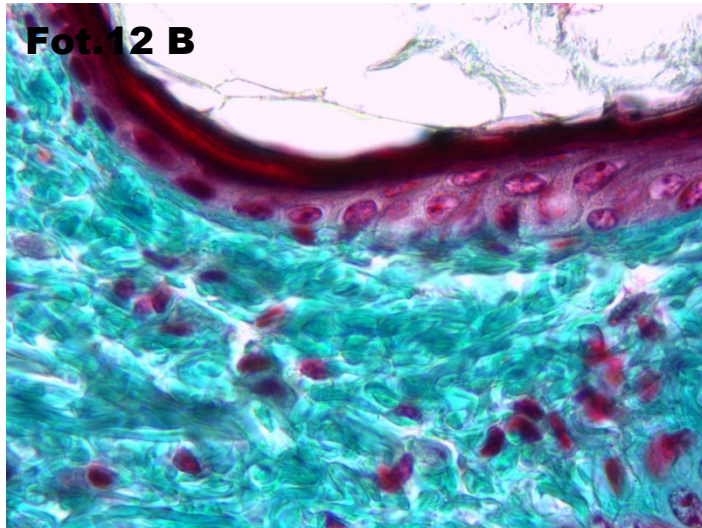


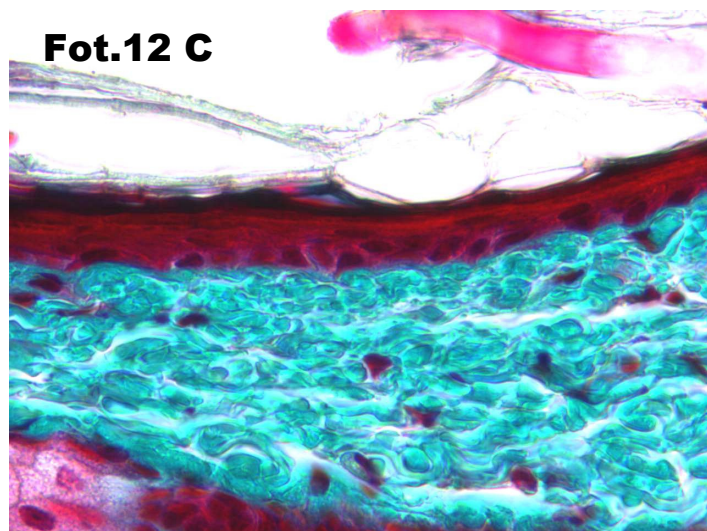
Fot.11. Fragment przekroju przez skórę świnki po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 5) z regenerującym się naskórkiem. Widoczne napływające miofibroblasty (↘). Barwienie metodą May-Grunwalda Giemsy. A, B - powiększenie obiektywu 40x. C, D - powiększenie obiektywu 100x. E, F - widoczne nagromadzenie granulocytów w skórze właściwej pod regenerującym się naskórkiem (↘). Barwienie metodą trójkromatyczną według Masson`a, powiększenie obiektywu 100x.

Fot.12 A



Fot.12 B





Fot.12. Fragment przekroju przez skórę świnki po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 12) z atypowym naskórkiem. Widoczne późniejsze etapy regeneracji nabłonka. Barwienie metodą trójkromatyczną według Masson`a. A - powiększenie obiektywu 20x, B, C - powiększenie obiektywu 100x.

Obserwowane zmiany mogą sugerować wczesne etapy uczulenia. W skórze zwierząt kontrolnych nie obserwowano zmian w obrębie naskórka, a w polu widzenia obserwowano tylko pojedyncze granulocyty w obrębie skóry właściwej (fot.5,6). Wyniki eksperymentu zostały przedstawione w Tabeli 10a, 10b i 10c.

Tabela 10a. Wyniki badania histopatologicznego wycinków skóry świnek morskich w teście maksymalizacji z propolisem

Grupa badana	NASKÓREK		SKÓRA WŁAŚCIWA			
	Morfologia	Leukocyty	Leukocyty	Przekrwienie naczyń	Obrzęk	
PROPOLIS	Świnka nr 1	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 2	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 3	Brak zmian	Liczne w polu widzenia neutrofile i monocyty	Nieliczne w polu widzenia neutrofile i monocyty	0	0
	Świnka nr 4	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 5	Atypowy nabłonek	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 6	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 7	Brak zmian	Nieobecne	Bardzo liczne mastocyty w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 8	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 9	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 10	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 11	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0

Tabela 10b. Wyniki badania histopatologicznego wycinków skóry świnek morskich w teście maksymalizacji z balsamem peruwiańskim

Grupa badana	NASKÓREK		SKÓRA WŁAŚCIWA			
	Morfologia	Leukocyty	Leukocyty	Przekrwienie naczyń	Obrzęk	
BALSAM PERUWIAŃSKI	Świnka nr 1	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 2	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 3	Uszkodzenie z naciekiem eozynofili	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 4	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 5	Rozległe obszary regenerujące go nabłonka	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 6	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 7	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 8	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 9	Brak zmian	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 10	Brak zmian	Nieobecne	Bardzo liczne mastocyty w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 11	Brak zmian	Nieobecne	Bardzo liczne mastocyty w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 12	Rozległe obszary cienkiego, atypowego nabłonka	Nieobecne	Nieliczne w polu widzenia	0	0

Tabela 10c. Wyniki badania histopatologicznego wycinków skóry świnek morskich w teście maksymalizacji w grupie kontrolnej

Grupa badana		NASKÓREK		SKÓRA WŁAŚCIWA		
		Morfologia	Leukocyty	Leukocyty	Przekrwienie naczyń	Obrzęk
KONTROLA	Świnka nr 1	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 2	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 3	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 4	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 5	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0
	Świnka nr 6	Brak zmian	Nieobecne	Pojedyncze w polu widzenia	0	0

Odsetek zwierząt, u których wystąpiła mobilizacja granulocytów podczas testu maksymalizacji świnki morskiej, co może sugerować wczesny etap reakcji alergicznej, przedstawiono w Tabeli 11.

Tabela 11. Odsetek świnek morskich, u których wystąpiła mobilizacja granulocytów w skórze

Rodzaj grupy	Liczba zwierząt, u których wystąpiła mobilizacja granulocytów	Odsetek zwierząt, u których wystąpiła mobilizacja granulocytów (%)
Badana z propolisem (P)	3/11	27,3
Badana z balsamem peruwiańskim (B)	5/12	41,7
Kontrola (K)	0	0

Przeprowadzona ocena liczby i składu procentowego krwinek białych nie wskazała jednoznacznie na podwyższenie liczby eozynofili w przypadkach, w których w badaniu histopatologicznym wskazano na mobilizację granulocytów, co mogłoby sugerować etap wstępny reakcji alergicznej. Wyniki oznaczenia procentowego oraz liczbowego leukocytów w rozmazie krwi zostały przedstawione w Tabeli 12.

Tabela 12. Oznaczenie liczbowe i procentowe granulocytów, eozynofili oraz bazofili w rozmazie krwi świnek morskich

Grupa*	Suma	Granulocyty obojętnochłonne o jądrze segmentowanym Norma 18-60%		Eozynofile Norma 1-5%		Bazofile Norma 0,3-0,8%	
		Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%
P1	156	102	65	4	2	1	0,6
P2	100	47	47	3	3	0	0
P 3	186	100	53	6	4	0	0
P4	130	62	48	5	4	0	0
P5	79	16	20	5	6	2	2,5
P6	113	47	42	10	9	0	0
P7	104	50	48	8	8	0	0
P8	66	33	50	11	17	0	0
P9	138	72	52	2	1	1	0,7
P10	111	80	68	6	5	1	0,9
P11	144	64	44	2	1	0	0
<hr/>							
B1	300	174	58	4	1	1	0,3
B2	166	92	55	5	3	0	0
B3	272	85	31	21	8	0	0
B4	100	48	48	2	2	0	0
B5	278	131	47	8	3	1	0,4
B6	59	24	40	1	2	0	0
B7	124	60	48	3	2	0	0
B8	148	87	59	5	3	0	0
B9	213	104	49	46	22	0	0
B10	46	13	28	1	2	0	0
B11	53	30	57	2	4	0	0
B12	177	114	64	2	1	0	0
<hr/>							
K1	121	67	55	3	2	0	0
K2	229	90	39	17	7	2	0,9
K3	263	141	54	4	1	1	0,4
K4	124	53	43	9	7	1	0,8
K5	31	11	36	0	0	0	0
K6	150	66	44	11	7	1	0,7

* P – propolis, B – balsam peruwiański, K - kontrola, numerami oznaczono poszczególne zwierzęta w badanej grupie

W Tabeli 13 przedstawiono niektóre wskaźniki fizjologiczne świnki morskiej.

Tabela 13. Wybrane wskaźniki fizjologiczne świnki morskiej

Wskaźnik fizjologiczny	Norma [%]
Neutrofile	18-60
Eozynofile	1-5
Limfocyty	55-80
Bazofile	0,3-0,8
Monocyty	1-2

Podwyższony poziom bazofili w porównaniu z oznaczonymi wartościami w grupie kontrolnej stwierdzono tylko w jednym przypadku po podaniu propolisu (świnka numer 5) i wynosił on 2,5%. Podwyższony poziom eozynofili w porównaniu z oznaczonymi wartościami w grupie kontrolnej (do 7% uznano za normę) stwierdzono w pięciu przypadkach, a mianowicie w trzech po podaniu propolisu (świnka numer 6, 7 i 8) oraz w dwóch po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 3 i 9).

Podwyższony poziom monocytów stwierdzono prawie w 90% przypadkach, w tym w grupie kontrolnej i dlatego tego wskaźnika nie brano pod uwagę w interpretacji wyników. Podobnie zawartość limfocytów jedynie w dwóch przypadkach była prawidłowa, w pozostałych 27 przypadkach zawartość limfocytów była poniżej normy, w tym również w grupie kontrolnej. Dlatego także tego wskaźnika nie brano pod uwagę podczas interpretacji wyników.

Podjęto próbę oznaczenia poziomu interferonu gamma (IFN- γ) u świnek morskich. We wszystkich próbkach, zarówno w grupach badanych, jak i w grupie kontrolnej, stężenie interferonu gamma było poniżej poziomu oznaczalności.

5. Dyskusja

Obserwacje dotyczące alergizujących właściwości propolisu na organizm człowieka wskazują, że jest to przede wszystkim alergia kontaktowa. Oznacza to, że uczulenie na działanie propolisu ujawnia się po miejscowym zastosowaniu tego produktu na skórę lub błony śluzowe [21,22]. Bardzo rzadko alergia na propolis dotyczy ogólnej reakcji alergicznej organizmu typu anafilaktycznego [15].

Częstość występowania alergii kontaktowej na propolis jest różna w różnych rejonach, a nawet okolicach i zależy w dużej mierze od „bazy pożytkowej”. W Europie Środkowej pszczoły do produkcji propolisu wykorzystują między innymi żywicę z młodych pąków topoli, która zawiera estry kwasu kawowego. Jak wykazano w badaniach, estry kwasu kawowego są substancjami o silnych właściwościach alergizujących i to one w dużej mierze odpowiadają za wywoływanie nadwrażliwości kontaktowej [81,82,83].

Z przeglądu piśmiennictwa wynika też, że alergia kontaktowa na propolis występuje znacznie częściej u ludzi z chorobami dermatologicznymi niż u ludzi zdrowych, a grupą szczególnie narażoną na wystąpienie alergicznego kontaktowego zapalenia skóry są pszczelarze, którzy z racji wykonywanego zawodu mają długotrwały kontakt z alergenami zawartymi w propolisie [15,21]. Niektóre doniesienia sugerują również, że częstość uczulenia na propolis może się zwiększać ze względu na jego powszechne występowanie w wielu produktach kosmetycznych, takich jak: balsamy do ust, płyny, szampony, odżywki, pasty do zębów, produktach leczniczych (np. maści, żele, spray, krople) oraz suplementach diety [107,111]. Stąd częstość występowania alergicznego kontaktowego zapalenia skóry na propolis ciągle budzi kontrowersje.

Celem tego badania była ocena częstości występowania alergii kontaktowej wśród grupy najbardziej narażonej na kontakt z propolisem z racji wykonywanego zawodu, czyli u polskich pszczelarzy i ich rodzin, jak również ocena potencjału alergizującego propolisu w teście maksymalizacji na świnkach morskich.

Częstość występowania alergii kontaktowej na propolis wśród pszczelarzy oceniono na podstawie ankiet rozesłanych do pszczelarzy z różnych regionów Polski.

Z analizy 558 ankiet odesłanych przez pszczelarzy z 6 województw wynika, że średnio 3,05% z nich jest uczulonych na propolis, przy czym przypadki alergii kontaktowej odnotowano jedynie w dwóch województwach, tj. lubelskim i małopolskim. Częstość występowania alergii kontaktowej w Małopolsce jest jednak o ponad połowę niższa niż w województwie lubelskim. Natomiast w pozostałych województwach (podlaskie,

wielkopolskie, dolnośląskie i lubuskie) nie zgłoszono występowania alergii na propolis. Uzyskane wyniki sugerują, że występowanie alergii na propolis w poszczególnych województwach zależy nie tylko od „bazy pożytkowej”, ale również od zanieczyszczenia środowiska. Tereny czyste ekologicznie nie sprzyjają występowaniu alergii na propolis. Według ekologicznej mapy Polski zawartość ołowiu w glebie jest największa w województwie śląskim, a następnie małopolskim. Województwa o najmniejszej zawartości ołowiu w glebie to podlaskie, pomorskie, kujawsko-pomorskie, wielkopolskie oraz lubuskie i właśnie w tych rejonach nie stwierdzono żadnego przypadku alergii na propolis. Kwestia zanieczyszczenia terenów w korelacji z możliwością wystąpienia alergii powinna być przedmiotem dalszych szczegółowych badań.

Ponad 60% ankietowanych trudni się pszczelarstwem ponad 15 lat. Z przeprowadzonego badania ankietowego na terenie województwa małopolskiego wynika, że u jednego pszczelarza alergia kontaktowa na propolis wystąpiła po ponad 20 latach zajmowania się pszczelarstwem, nie wliczając ekspozycji na propolis w dzieciństwie (ojciec pszczelarz [95]). Porównując częstość występowania alergii na propolis w powyższym badaniu z dotychczas przeprowadzonymi w Polsce i na świecie można stwierdzić, że alergia na propolis u pszczelarzy nie jest zjawiskiem powszechnym i nie stanowi większego zagrożenia z uwagi na charakter alergii, jak i stosunkowo długi czas ekspozycji niezbędny do wystąpienia objawów alergii [86,88,89,90]. Średni czas wystąpienia alergii kontaktowej na propolis według niemieckich badaczy wynosi 9,5 lat [16]. W Tabeli 14 zestawiono wyniki badań alergii na pszczelarzach pochodzące z różnych danych literaturowych.

Tabela 14. Zestawienie danych literaturowych na temat alergii na propolis u pszczelarzy

Populacja	Liczba badanych	% alergii	Literatura
Pszczelarze (Małopolska)	297	4,04%	Illg J. i wsp. [90]
Rolnicy z podejrzeniem choroby zawodowej skóry (Polska)	132	0,76%	Kieć-Świerczyńska M. i wsp. [91]
Rolnicy z podejrzeniem choroby zawodowej skóry (Polska)	101	2%	Śpiewak R. [92]
Pszczelarze (Niemcy)	1051	3,6%	Münstedt K. i wsp. [16]
Pszczelarze (Polska)	558	3,05%	Basista K. [118]
Średni % pszczelarzy uczulonych na propolis	2,86% (0,76 – 4,04%)		

Dodatkowo porównując wynik tego badania na terenie województwa małopolskiego z badaniem przeprowadzonym na tym samym obszarze w roku 1976 przez Illga i wsp. [90] można stwierdzić, iż odsetek pszczelarzy uczulonych na propolis w województwie małopolskim zmniejszył się. Według Illga wynosił 4,04%, natomiast obecnie 3,48%. Zmniejszenie częstości występowania alergii na propolis wśród pszczelarzy w Małopolsce z dużym prawdopodobieństwem można powiązać z masowym wycinaniem topoli i w związku z tym zmniejszeniem jednego z głównych składników propolisu o silnych właściwościach alergizujących, tzn. estrów kwasu kawowego występujących w żywicy pąków topoli.

W oparciu o wyniki badań można uznać, iż propolis jest znanym alergenem dla pszczelarzy i nie stanowi on powszechnego zagrożenia dla tej grupy zawodowej. Z uzyskanych od pszczelarzy danych, jak również opublikowanych danych niemieckich wynika, że pszczelarze wiedzą o działaniu alergizującym propolisu, a mimo to często nie rozpoznają problemu i kontynuują swoją pracę bez zabezpieczenia się przed kontaktem z propolisem, a nawet sami zażywają doustnie propolis profilaktycznie i terapeutycznie w zakażeniach górnych dróg oddechowych lub miejscowo do leczenia ran i oparzeń [118].

Prawie $\frac{3}{4}$ badanej populacji pszczelarzy stosowało propolis ze względu na właściwości prozdrowotne. Niemniej jednak pszczelarze powinni być świadomi możliwości wystąpienia alergii kontaktowej na propolis i podejmować środki ostrożności ograniczające bezpośredni kontakt z propolisem, gdyż alergia na ten surowiec może wystąpić nawet po wielu latach. Dlatego pszczelarze przy pracy w pasiece powinni nosić ochronne rękawice zabezpieczające ich ręce przed bezpośrednim kontaktem z alergenami występującymi w propolisie, a do czyszczenia rąk po pracy nie używać rozpuszczalników, które mogą ułatwiać transport alergenów do głębszych warstw skóry [16,17].

Czynnikami, które mogą mieć wpływ na wystąpienie alergii na propolis mogą być choroby o podłożu alergicznym, szczególnie takie jak: atopowe zapalenie skóry bądź uczulenie na inne alergeny powodujące wysypki skórne. Według danych uzyskanych w tym badaniu, 3 na 4 pszczelarzy z atopowym zapaleniem skóry było uczulonych na propolis. U prawie 30% pszczelarzy deklarujących występowanie uczuleń wystąpiła alergia na propolis. Dlatego osoby z atopowym zapaleniem skóry, alergicy oraz chorzy dermatologiczni powinni unikać stosowania preparatów z propolisem.

Uzyskane wyniki są zgodne z danymi literaturowymi, które jednoznacznie wskazują, że niebezpieczeństwo nadwrażliwości w postaci alergicznego kontaktowego zapalenia skóry na alkoholowy ekstrakt propolisowy częściej występuje u chorych dermatologicznych, leczonych wcześniej z powodu dermatoz alergicznymi i waha się od 1,2 % - 6,7 % (średnio 3,82%) niż u ludzi zdrowych [83,95,99,99,100,105,106].

W przeprowadzonych w latach 1981-1987 badaniach na dużej grupie pacjentów z chorobami dermatologicznymi (7483 osoby) Hegyi i wsp. [97] wykazali, że wśród nich 1,82% było uczulonych na alkoholowy ekstrakt propolisowy. Równocześnie w grupie 1558 zdrowych ochotników nadwrażliwość na propolis obserwowano jedynie u 0,64% osób.

Z przeglądu danych literaturowych wynika, że u ludzi z chorobami dermatologicznymi alergia kontaktowa występuje znacznie częściej niż u ludzi zdrowych nie tylko na propolis. W badaniu przeprowadzonym przez Bauera i wsp. [105] porównano potencjał uczulający kilku alergenów kontaktowych u pacjentów dermatologicznych, w tym propolisu. Stwierdzono dodatnie próby uczuleniowe na wyciąg z rumianku u 2,9% badanej populacji, to jest więcej niż w przypadku propolisu (propolis wywoływał uczulenie u 17 pacjentów = 2,8%). Znaczny odsetek uczuleń odnotowano w przypadku chlorowodoru dibukainy, pozytywne reakcje u 7,4% badanych. W przypadku wyciągu z arniki u 2,1% grupy badanej wystąpiły reakcje uczuleniowe. Balsam peruwiański uczulał 6,6% pacjentów, podczas, gdy benzokaina alergizowała 3,2% populacji badanej, a thimerosal (tiomersal) 5,5%.

W Tabeli 15 przedstawiono dane na temat uczulenia na alergeny kontaktowe w populacji chorych dermatologicznych, zebrane na podstawie publikacji Bauer [105] oraz danych zaczerpniętych z podręcznika p.t.: „Alergia na leki z uwzględnieniem odczynów anafilaktoidalnych i idiosynkrazji” pod redakcją Rudzkiego [15].

Tabela 15. Zestawienie porównawcze alergenów kontaktowych

Substancja	Odsetek pozytywnych reakcji wśród alergików
Sulfonamidy	9,9% (19,3% u chorych z wypryskiem)
Chlorowodorek cynchokainy (chlorowodorek dibukainy)	7,4 %
Balsam peruwiański	6,6%
Ampicylina, amoksycylina	4,5%
Wyciąg z rumianku	2,9%
Benzokaina	2,7%
Propolis	2,5% (3-5% chorych z wypryskiem)
Kalafonia	2,3%
Siarczan neomycyny	2,1 % (u chorych na wyprysk 7%)
Nalewka z arniki	2,1%
Clotrimazol	1,8%
Oxycort	0,5-1,5% (7,3% pacjentów ze <i>statis dermatitis</i>)
Cefalosporyny	1%-3%
Tetracykliny	6,4%

Cytowane powyżej dane z badania własnego, jak i z piśmiennictwa odnoszą się do osób dorosłych. Z badań na dzieciach i młodzieży w Polsce przeprowadzonych przez Czarnobilską i wsp. [111], wynika, że odsetek uczulonych na propolis w tych grupach jest

większy. Największą częstość alergii kontaktowej na propolis zaobserwowano u dzieci w wieku 7-8 lat (16,5%), w porównaniu do 5,4% u dzieci w wieku 16-17 lat. Przytoczone dane wskazują, że propolis jest haptenem o silnych właściwościach alergizujących u dzieci ze zmianami dermatologicznymi i dlatego należy zachować szczególną ostrożność w stosowaniu propolisu u dzieci, zwłaszcza z wypryskiem kontaktowym. Rutynowa diagnostyka dzieci chorych na wyprysk kontaktowy powinna obejmować testy z tym haptenem.

Z przeglądu dostępnych w piśmiennictwie danych eksperymentalnych można wyciągnąć wniosek, że maści zawierające w swoim składzie etanolowe ekstrakty propolisowe często wywołują reakcje alergiczne typu późnego u świnek morskich [81,82,83,101,117], przy czym siła reakcji alergicznej w dużym stopniu zależy od stężenia ekstraktu propolisowego. Jak wykazał w badaniu Czarnecki [114], maść z zawartością 3% etanolowego ekstraktu propolisowego zastosowana na niezmienną skórę świnek morskich nie spowodowała odczynu alergicznego o charakterze nadwrażliwości typu późnego.

Wykrywanie działania alergizującego badanych substancji na zwierzętach doświadczalnych polega na stosowaniu na ogoloną i odtłuszczoną skórę tych zwierząt określonej ilości badanej substancji podawanej w określonych dniach, a następnie po określonym ściśle czasie wywoływaniu odczynu alergicznego za pomocą tej samej substancji w stężeniu niższym od stosowanego uprzednio.

Obecnie zalecanym testem oznaczenia potencjału uczulającego substancji jest test maksymalizacji świnki morskiej, będący zmodyfikowaną metodą Kligmana i Magnussona. Test ten jest zgodny z wytyczną *OECD Guideline for testing of chemicals - Skin sensitization*. Wytyczne OECD są zbiorem około 100 najbardziej odpowiednich metod badań uzgodnionych na szczeblu międzynarodowym wykorzystywanych przez rządy, przemysł i niezależne laboratoria w celu określenia i scharakteryzowania potencjalnych zagrożeń dotyczących substancji, preparatów i mieszanin chemicznych.

Test maksymalizacji świnki morskiej (GPMT) służy do oceniania czy dana substancja ma właściwości uczulające, a dokładniej czy może wywołać alergiczne kontaktowe zapalenie skóry, które jest immunologiczną reakcją skórną na daną substancję. Metoda składa się z fazy ekspozycji indukcyjnej, czyli eksperymentalnej ekspozycji na substancję testowaną z zamiarem wywołania stanu nadwrażliwego oraz fazy ekspozycji prowokacyjnej, czyli eksperymentalnej ekspozycji podmiotu poddanego wcześniej działaniu substancji testowanej, następującej po okresie indukcji w celu ustalenia czy podmiot reaguje w sposób

nadwrażliwy. Między fazą indukcji oraz prowokacji musi wystąpić okres indukcji, czyli co najmniej jeden tydzień po ekspozycji indukcyjnej podczas którego stan nadwrażliwości może się rozwinąć.

U ludzi reakcje skórne mogą charakteryzować się swędzeniem, rumieniem, obrzękiem, grudkami, pęcherzykami, wzniesieniami naskórka wypełnionymi przezroczystą, wodną cieczą. W przypadku innych gatunków reakcje mogą się różnić i mogą być obserwowane tylko rumień i obrzęk. Do oceny działania alergizującego przyjęto 4-stopniową skalę zaproponowaną przez Magnussona i Kligmana gdzie: 0 – oznacza brak widocznych zmian, 1 - łagodny lub plamkowy rumień, 2 - umiarkowany lub zlewający się rumień oraz 3 - silny rumień i obrzęk.

W zastosowanym w pracy teście maksymalizacji świnki morskiej oznaczono potencjał alergizujący propolisu oraz porównano go z potencjałem alergizującym balsamu peruwiańskiego, czyli alergenem z którym propolis może reagować krzyżowo. Balsam peruwiański jest produktem pochodzenia roślinnego, dawniej był szeroko stosowanym jako substancja zapachowa kosmetyków oraz jako dodatek do leków pobudzających ziarninowanie, leków dentystrycznych, syropów przeciwkaszlowych, czopków doodbytniczych. W badaniu na świnkach morskich wykazano, że propolis nie uczulił żadnego zwierzęcia, natomiast po podaniu balsamu peruwiańskiego u jednej świnki podczas pierwszej obserwacji widoczny był niewielki rumień. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o braku potencjału alergizującego propolisu przy zastosowanym stężeniu oraz o słabym potencjale uczulającym balsamu peruwiańskiego zastosowanym w analogicznym stężeniu.

Dodatkowo świnki morskie ważono przed rozpoczęciem badania oraz po zakończonym eksperymencie w celu sprawdzenia ich stanu zdrowia. Spadek wagi o 10% i więcej może wskazywać na toksyczność układową danej substancji [119]. W trakcie trwania badania wszystkie świnki z każdej grupy przybrały na wadze. Wzrost wagi wahał się od 12,1 do 39,2%, co świadczy o dobrym stanie zdrowia zwierząt oraz o braku potencjalnej toksyczności układowej badanych substancji.

Obraz histopatologiczny alergicznego kontaktowego zapalenia skóry (ACD) jest charakterystyczny, cechuje się obrzękiem (spongioza) i przerostem warstwy kolczystej naskórka (akantozą), niepełnym rogowaceniem (parakeratoza) oraz naciekami limfocytarnymi w górnych warstwach skóry właściwej [125].

W przeprowadzonym badaniu histologicznym wycinków skóry zwierząt nie wykazano objawów alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, a jedynie w kilku przypadkach

mobilizację leukocytów. Obserwowany atypowy, regenerujący się naskórek u zwierząt po podaniu propolisu (świnka numer 5) oraz po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 3, 5 oraz 12) można byłoby tłumaczyć mechanicznym uszkodzeniem. Jednakże w grupie kontrolnej takich uszkodzeń nie stwierdzono, dlatego powyższe zmiany mogą wskazywać na wczesne stadia reakcji alergicznej.

Wyniki leukogramu nie wskazują także jednoznacznie na wystąpienie alergii. Jedyne w kilku przypadkach zaobserwowano podwyższony poziom eozynofili, co mogłoby świadczyć o uczuleniu na zastosowane substancje. A mianowicie, podwyższony poziom eozynofili obserwowano w trzech przypadkach po podaniu propolisu (świnka numer 6, 7, 8) oraz w dwóch przypadkach po podaniu balsamu peruwiańskiego (świnka numer 3 i 9). Z drugiej strony warto podkreślić, że świnki z grupy propolisu numer 6 oraz numer 8 nie wykazały żadnych zmian w badaniu histopatologicznym oraz w ocenie wizualnej (odczyt I i II). Podobnie świnka numer 9 z grupy balsamu peruwiańskiego również w badaniu histopatologicznym nie wykazała żadnych oznak wystąpienia sensybilizacji skóry.

O wystąpieniu alergii można mówić jedynie u jednej świnki numer 3 z grupy balsamu peruwiańskiego. Podczas pierwszego odczytu wystąpił u niej rumień o nasileniu 1 w skali Kligmana i Magnussona, który znikł podczas drugiego odczytu po 72 godzinach od fazy prowokacyjnej. Dodatkowo w badaniu histopatologicznym stwierdzono uszkodzenie naskórka z naciekiem eozynofili, a w rozmazie krwi stwierdzono podwyższenie poziomu eozynofili do 8%. Można zatem uznać, że balsam peruwiański uczulił jedną świnkę z 12 (8,33% zwierząt), co pozwala go zakwalifikować do grupy alergenów kontaktowych, co zresztą jest zgodne z danymi literaturowymi.

Alergiczne kontaktowe zapalenie skóry (ACD) jest postacią kliniczną alergii kontaktowej. Jest to najczęstszy objaw narządowy alergii kontaktowej, która jest swoistą nadwrażliwością organizmu na substancje chemiczne o małej masie cząsteczkowej (hapteny) lub proteiny. Alergia kontaktowa może także objawiać się jako alergiczne kontaktowe zapalenie śluzówki jamy ustnej, oskrzeli, spojówek, pochwy, a nawet jako reakcje ogólnoustrojowe. Alergia kontaktowa jest indukowana przez bezpośredni kontakt tych substancji ze skórą. Według danych literaturowych alergia kontaktowa występuje u około 40% dorosłych oraz u 20-30% dzieci i młodzieży [120].

Uczulenie na propolis przejawia się głównie jako ACD i jest tłumaczone IV typem reakcji immunologicznej według Gella i Coombsa, w którym to największą rolę w powstawaniu alergii mają limfocyty Th₁ oraz cytokiny wydzielane przez te limfocyty.

Z cytokin wydzielanych przez limfocyty Th₁ główne znaczenie dla rozwoju alergii kontaktowej ma interferon gamma, co potwierdzają badania w modelach eksperymentalnych na myszach, w których obserwowano znaczny wzrost stężenia IFN gamma [14,117,122,123]. Wśród cytokin wydzielanych przez limfocyty T zarówno cytokiny typu 1 jak i typu 2 są wytwarzane w alergii kontaktowej. Cytokiny typu 1, takie jak interferon gamma i IL-12 dominują w trakcie rozwoju nadwrażliwości typu opóźnionego [124]. Interferon gamma jest ważnym elementem odpowiedzi zapalnej, gdyż powoduje indukcję nacieku jednojądrowych komórek, wyzwała wzrost ekspresji ICAM-1, cząsteczki aktywnej w procesie chemotaksji i indukuje wzrost ekspresji cząsteczek MHC klasy I, istotnych w procesie prezentacji antygenów [125].

W badaniach na gryzoniach udowodniono ponadto, że różne rodzaje cytokin mają znaczenie w różnych typach odpowiedzi immunologicznej. U myszy po miejscowej ekspozycji na alergeny kontaktowe indukowana jest selektywna odpowiedź z wytwarzaniem przez napływające komórki wysokich ilości IFN gamma oraz stosunkowo niskich ilości cytokin typu 2. Natomiast ekspozycja myszy na chemiczne alergeny oddechowe (ta sama droga i podobne warunki wywołania całkowitej immunogenności jak po ekspozycji na alergeny kontaktowe) daje odwrotne efekty. W takich przypadkach komórki produkują wyższe poziomy cytokin typu 2 i stosunkowo małe ilości IFN gamma [126].

Po zakończeniu eksperymentu podjęto próbę oznaczenia poziomu interferonu gamma w surowicy krwi świnek morskich. Niestety, zarówno w grupach badanych, jak i w grupie kontrolnej, stężenie interferonu gamma w badanych próbkach było poniżej poziomu oznaczalności.

Przeprowadzone badanie potencjału alergizującego propolisu według testu maksymalizacji świnki morskiej nie potwierdziło wyników badania Petersena z 1977 roku, w którym to propolis uczulił aż 76% zwierząt i został zakwalifikowany jako silny alergen. Obserwowane rozbieżności w wynikach są konsekwencją istotnych różnic pomiędzy "starą wersją" metody Kligmana i Magnussona z 1969 [127] użytą przez Petersena, a obecnie zalecaną przez OECD guideline. Metoda Kligmana i Magnussona z 1969 jest obecnie krytykowana nawet przez samych autorów metody jako dająca fałszywie dodatnie wyniki [128].

OECD zaleca zastosowanie w fazie indukcji stężenia dobrze tolerowanego systemowo, a równocześnie powodującego słabe do umiarkowanego podrażnienie skóry. Petersen zastosował w fazie indukcji w podaniu śródskórnym 5% roztwór propolisu w glikolu

propylenowym oraz w podaniu naskórnym 50% roztwór propolisu w etanolu, który sam może powodować podrażnienie skóry. Jak bowiem wykazano próg podrażnienia dla propolisu występuje przy stężeniu wyższym niż 20% [115]. Dlatego zastosowane przez Petersena stężenie 50% propolisu powodowało działanie drażniące o silnym charakterze.

Ponadto udowodniono, że glikol propylenowy jest substancją wzmacniającą przenikanie innych substancji w głąb skóry w różnym mechanizmie działania. Jednym z proponowanych mechanizmów zwiększania penetracji przez glikol propylenowy jest modyfikacja funkcjonowania bariery skóry poprzez wpływ na strukturę keratyny oraz zwiększanie stężenia roztworu w warstwie rogowej naskórka [129].

W badaniu powinno stosować się jeden i ten sam nośnik, aby wyeliminować ryzyko wywołania podrażnienia lub uczulenia przez różne nośniki. Petersen zastosował jako nośnik etanol oraz glikol propylenowy.

W fazie prowokacyjnej OECD zaleca zastosowanie stężenia najwyższego niedrażniającego. Petersen zastosował 25% roztwór etanolowy propolisu, który może powodować podrażnienie od słabego do umiarkowanego. W tym badaniu zastosowano 5% roztwór etanolowy propolisu, jako, że jest to najwyższe stężenie stosowane w lekach z propolisem dopuszczonych w Polsce oraz jest to stężenie niewywołujące działania drażniącego. Stężenie 10% jest wykorzystywane w testach kontaktowych do wywołania uczulenia.

Zgodnie z zaleceniami OECD w teście maksymalizacji świnki morskiej w grupie kontrolnej nakładany bądź wstrzykiwany jest nośnik. Petersen jako kontrolę działania alergizującego stosował również dinitrochlorobenzen (DNCB). Obecnie używanie DNCB - najsilniejszego alergenu jako kontroli nie jest zalecane [129].

Test maksymalizacji świnki morskiej (GPMT) jest szeroko stosowany łącznie ze środkiem wspomagającym wytwarzanie przeciwciał przez organizm - kompletnym adjuwantem Freund (FCA). Testy ze środkiem wspomagającym wytwarzanie przeciwciał są uważane za bardziej precyzyjne w przewidywaniu prawdopodobnego działania sensybilizującego badanej substancji na ludzką skórę niż metody niestosujące kompletnego adjuwantu Freund. Są zatem metodami preferowanymi. Pomimo, iż kilka innych metod może być wykorzystanych w celu oznaczenia potencjału substancji do wywołania reakcji sensybilizacji skóry, jak na przykład test Buehlera, GPMT uważa się za preferowaną technikę oznaczania. W testach ze środkiem wspomagającym stan alergiczny jest potęgowany przez rozpuszczenie lub utworzenie zawiesiny substancji testowanej w FCA [130]. W teście stosowanym przez Petersena nie stosowano odczynnika FCA.

Wyniki testu zgodnie z zaleceniami OECD odczytywano po 48 godzinach i po 72 godzinach od zastosowania dawki wywołującej. W badaniu Petersena wykonano tylko jeden odczyt, nie sprecyzowano w jakim czasie po zastosowaniu dawki wywołującej. Różnice pomiędzy metodami przedstawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Porównanie metody GPMT z 1969 roku oraz metody GPMT zalecaną obecnie przez OECD

Różnice		GPMT według Magnussona i Kligmana z 1969	GPMT - modyfikacja według OECD <i>Guideline for testing of chemicals - Skin sensitisation</i>
Dobór kontroli		Etanol i glikol propylenowy	Etanol
Stosowanie DNCB		TAK	NIE
Stężenie propolisu		5%, 50%, 25%	20%, 20%, 5%
Nośnik		Glikol propylenowy w iniekcji oraz etanol w podaniu na skórę	Etanol w iniekcji oraz nakładany na skórę
Indukcja	Podanie śródskórne	5% r-r propolisu w glikolu propylenowym	20% r-r propolisu w etanolu
	Podanie naskórne	50% r-r propolisu w etanolu	20% r-r propolisu w etanolu
Prowokacja		25% r-r propolisu w etanolu	5% r-r propolisu w etanolu
Użycie FCA		NIE	TAK
Obserwacja		I odczyt	24 h i 72 h po zastosowaniu dawki wywołującej

Należy także zauważyć, że w dużym stężeniu podczas długiego oraz częstego stosowania prawie każda substancja może wywołać kontaktową alergię u osób do tego predysponowanych [128]. Nawet leki o działaniu przeciwzapalnym i przeciwalergicznym jak glikokortykosteroidy mogą uczulić pacjentów, zwłaszcza z chorobami skóry jak kontaktowe zapalenie skóry, atopowe zapalenie skóry, wyprysk kontaktowy. Maści zawierające glikokortykosteroidy kontaktują się ze skórą już zmienioną zapalnie, ułatwia to penetrację

leku, a tym samym ułatwia alergizację [132,133]. Wśród pacjentów klinik dermatologicznych w Europie częstość występowania nadwrażliwości na steroidy wynosi 2,6%. W poszczególnych krajach odsetek ten jest różny, od 0,4% w Hiszpanii (Barcelona), poprzez 2,3% w Holandii (Amsterdam) do 6,4% w Belgii [134].

Negatywny wynik w teście maksymalizacji świnki morskiej pozwala na przewidzenie bezpieczeństwa substancji. Generalnie żadne więcej testy nie są wymagane w celu określenia możliwości substancji do wywoływania sensybilizacji skóry. Jednak istnieją pewne wyjątki. Nikiel jest jednym z najbardziej znanych alergenów kontaktowych, jednak w teście GPMT jest bardzo ciężko wywołać alergię na nikiel [135]. Wyniki fałszywie ujemne jak ten opisany powyżej są bardzo rzadkie, niemniej jednak się zdarzają. I odwrotnie, substancja, która jest w teście GPMT silnym alergenem nie powinna być z automatu odrzucona z użycia, szczególnie jeśli posiada korzystne właściwości [128]. W tej sytuacji powinno się zawsze oszacować stosunek korzyści do ryzyka.

Reasumując – propolis może być alergenem kontaktowym dla pszczelarzy, jednakże alergia kontaktowa w tej grupie zawodowej nie jest zjawiskiem powszechnym. Inaczej na kontakt miejscowy z propolisem reagują pszczelarze zdrowi i inaczej pszczelarze ze zmianami dermatologicznymi, a zwłaszcza z atopowym zapaleniem skóry. Badania wykazały, że u zdrowej populacji pszczelarzy odsetek uczulonych na propolis wynosi zaledwie 0,97 %, podczas gdy u pszczelarzy alergików odsetek ten wynosi aż 28,9 %. Alergia kontaktowa na propolis u pszczelarzy rozwija się po kilku latach pracy w pasiece (według danych niemieckich średnio po 9,5 latach) i w dużej mierze zależy od zawartości składników. Pszczelarze alergicy nie są bardziej narażeni na alergię kontaktową na propolis niż chorzy leczeni wcześniej z powodu dermatoz skórnych. Pszczelarze uczuleni na propolis powinni zachować szczególną ostrożność podczas pracy w pasiece, unikać bezpośredniego kontaktu z propolisem poprzez stosowanie środków ochrony osobistej (np. rękawiczki), nie stosować rozpuszczalników do mycia brudnych rąk oraz nie stosować propolisu w celach terapeutycznych.

Propolis w stężeniu 5% w roztworze etanolu – w przeciwieństwie do balsamu peruwiańskiego - nie wykazał działania alergizującego w teście maksymalizacji u świnki morskiej. Dostępne na rynku farmaceutycznym produkty zawierają etanolowy ekstrakt propolisu w stężeniu nieprzekraczającym 5%, a zatem ich stosowanie miejscowe u ludzi zdrowych, niemających chorób dermatologicznych, wydaje się bezpieczne. Alergia kontaktowa na propolis występuje u ludzi zdrowych rzadko. Natomiast u osób z chorobami

dermatologicznymi niebezpieczeństwo wystąpienia alergii kontaktowej jest większe, ale w większości przypadków jest do uniknięcia po przeprowadzeniu wywiadu lekarskiego, wczesnym odstawieniu stosowanego preparatu propolisowego i wykonaniu płatkowych testów uczuleniowych.

6. Wnioski

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że:

- Propolis może być alergenem kontaktowym dla pszczelarzy, jednakże alergia kontaktowa w tej grupie zawodowej nie jest powszechnym zjawiskiem.
- Prawdopodobieństwo rozwoju nadwrażliwości kontaktowej na propolis jest mniejsze u pszczelarzy zdrowych, bez alergicznych dermatoz skórnych niż u pszczelarzy z chorobami alergicznymi.
- U zdrowej populacji pszczelarzy odsetek uczulonych na propolis wyniósł 0,97%, podczas gdy u pszczelarzy z chorobami alergicznymi odsetek ten wyniósł aż 28,9%.
- Częstość występowanie alergii kontaktowej wśród pszczelarzy zdrowych jest porównywalna z częstością występowania alergii kontaktowej u osób zdrowych, która waha się od 0,76 – 4, 3%.
- Występowanie alergii kontaktowej na propolis wśród pszczelarzy jest różne w różnych rejonach kraju – największe w województwie lubelskim i małopolskim.
- Pszczelarze powinni zachować szczególną ostrożność podczas pracy w pasiece, unikać bezpośredniego kontaktu z propolisem poprzez stosowanie środków ochrony osobistej (np. rękawiczki).
- W teście maksymalizacji świnki morskiej propolis w stężeniu 5% nie wykazał działania alergizującego, natomiast balsam peruwiański zastosowany w analogicznym stężeniu wykazał właściwości alergizujące.
- Uzyskane wyniki u zwierząt doświadczalnych nie potwierdziły silnych właściwości alergizujących propolisu obserwowanych w badaniach wcześniejszych.
- Brak działania alergizującego propolisu w teście maksymalizacji u świnek morskich może wynikać z mniejszego stężenia propolisu użytego w badaniach, jak również ze zmniejszenia zawartości odpowiedzialnych za wywoływanie reakcji nadwrażliwości estrów kwasu kawowego w propolisie w związku z masowym wycinaniem topoli.
- Dostępne na rynku farmaceutycznym produkty zawierają etanolowy ekstrakt propolisu w stężeniu nieprzekraczającym 5%, a zatem ich stosowanie miejscowe u ludzi zdrowych, niemających chorób dermatologicznych, wydaje się bezpieczne.

7. Streszczenie

Propolis jest produktem pszczelim o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, przeciwzapalnych oraz ułatwiających gojenie ran. Propolis podany doustnie jest uznawany za produkt nietoksyczny i rzadko wywołujący reakcje nadwrażliwości. Natomiast opisywane są reakcje alergiczne podczas stosowania propolisu i jego preparatów zewnętrznie. Propolis jest zawodowym alergenem kontaktowym u pszczelarzy jako grupy najbardziej narażonej na kontakt z propolisem i zawarte w nim alergeny z racji wykonywanego zawodu.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej była ocena częstości występowania alergii kontaktowej wśród polskich pszczelarzy i ich rodzin, jak również ocena potencjału alergizującego propolisu w teście maksymalizacji na świnkach morskich.

W przeprowadzonym badaniu kwestionariuszowym wśród polskich pszczelarzy z 6 województw wykazano, że odsetek uczulonych na propolis wynosił 3,05%. Pszczelarze są bardziej narażeni na wystąpienie alergii niż populacja zdrowa (0,64%-1,3%), natomiast nie są bardziej narażeni na wystąpienie alergii niż chorzy dermatologiczni, leczeni wcześniej z powodu dermatoz alergicznych (1,2% - 6,7%). Z 2205 członków rodzin pszczelarzy stosujących propolis w celach prozdrowotnych (nie przy pracy w pasiece) jedynie u 14 osób (0,63%) wystąpiło uczulenie na propolis.

Dodatkowo w badaniu nie stwierdzono związku między uczuleniem na propolis a uczuleniami na inne produkty pszczele. Natomiast stwierdzono silną zależność między występowaniem atopowego zapalenia skóry a uczuleniem na propolis. Aż trzy na cztery osoby z AZS były uczulone na propolis. W grupie pszczelarzy z dermatozami skórnymi odsetek uczulonych na propolis wynosił 28,9%, podczas gdy w grupie pszczelarzy niealergików odsetek uczulonych na propolis wynosił 0,97%.

W badaniu na zwierzętach nie wykazano właściwości uczulających propolisu w teście maksymalizacji świnki morskiej (GPMT) w stężeniu 5%. W badanych fragmentach skóry również nie stwierdzono zmian charakterystycznych dla stanu zapalnego, a jedynie mobilizację granulocytów, głównie w obrębie skóry właściwej. Obserwowane zmiany mogą sugerować bardzo wczesne etapy nadwrażliwości. Natomiast w teście GPMT wykazano właściwości alergizujące balsamu peruwiańskiego zastosowanego w analogicznym stężeniu, co znalazło również potwierdzenie w badaniach histopatologicznych oraz podwyższonej eozynofilii. W skórze zwierząt kontrolnych nie obserwowano zmian w obrębie naskórka, a pojedyncze granulocyty obserwowano tylko w obrębie skóry właściwej. Próba oznaczenia stężenia interferonu gamma w surowicy krwi badanych zwierząt nie powiodła się ze względu

na jego zbyt niski poziom - poniżej granicy oznaczalności - zarówno w grupie z propolisem, jak i balsamem peruwiańskim i grupie kontrolnej.

Uzyskane wyniki u zwierząt doświadczalnych nie potwierdziły silnych właściwości alergizujących propolisu obserwowanych w badaniach wcześniejszych. Brak działania alergizującego propolisu w teście maksymalizacji świnki morskiej może wynikać z mniejszego stężenia propolisu użytego w badaniach, jak również ze zmniejszenia zawartości odpowiedzialnych za wywoływanie reakcji nadwrażliwości estrów kwasu kawowego w propolisie w związku z masowym wycinaniem topoli.

Wyniki w prezentowanej rozprawie były częściowo przedmiotem:

a) publikacji:

1. Basista K.M., Filipek B.: Allergy to propolis in Polish beekeepers. *Postępowanie Dermatologiczne i Alergologiczne* 2012; 29 (6): 440-445.
2. Basista K., Filipek B., Sodzawiczny S.: Bee pollen allergy in Polish beekeepers and their families. *Postępowanie Dermatologiczne i Alergologiczne* 2012; 29 (5): 343-347
3. Basista-Sołtys K., Filipek B.: Potencjał alergogenny propolisu - przegląd danych literaturowych. *Alergia Astma Immunologia* 2013, 18 (1): 32-38.
4. Basista K.: Direct and airborne contact dermatitis in a beekeeper from the Małopolska region. *Int J Occup Med Environ Health*. 2012 Sep;25(4):499-500.
5. Basista K.: Honey - biological and pro-health activity and its allergic potential. *Alergologia Immunologia*, 2012, 9 (2-3), 97-100.

b) plakatu:

1. Basista K., Filipek B.: Uczulenie na propolis wśród polskich pszczelarzy. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe*, nr 4 (1/2012), 4.
2. Basista-Sołtys K., Filipek B.: Alergia na pyłek pszczoły wśród pszczelarzy i ich rodzin. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe*, nr 1 (1/2013), 21.
3. Basista-Sołtys K., Filipek B.: Ocena potencjału alergizującego propolisu w teście maksymalizacji na świnkach morskich oraz jego porównanie z potencjałem alergizującym balsamu peruwiańskiego. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów UJ Nauki Ścisłe*, nr 8 (1/2014), 40.

8. Piśmiennictwo:

1. Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.: Produkty pszczół w medycynie. Wyd.1. Wydawnictwo Spółdzielnia Pszczelarska „Apis”, Lublin, 2007.
2. Ellnain-Wojtaszek M.: Produkty pszczele – cenne leki medycyny naturalnej. Wyd. 1. Gospodarstwo Pasieczne „Sądecki Bartnik”, Nowy Sącz, 1998.
3. Castaldo S., Capasso F.: Propolis, an old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia*, 2002, 73(Suppl. 1), 1-6.
4. Marcucci M.C.: Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 1995, 26, 83-99.
5. Kędzia B.: Skład chemiczny propolisu polskiego. Cz. I. Początkowy okres badań. *Postępy Fitoterapii* 2009, 1, 39-44.
6. Tichonow A.I., Sodzawiczny K., Tichonow S.A. i wsp.: Propolis – Teoria i praktyka wytwarzania leczniczych preparatów propolisowych. Redakcja wydania polskiego: Kędzia B., Sodzawiczny K.. Wyd. 1. Kraków: Apipol- Farma, 2008.
7. Kędzia B., Hołderna-Kędzia E.: Leczenie propolisem chorób skóry wywołanych przez drobnoustroje. *Postępy fitoterapii* 2007, 1, 23-30.
8. Kędzie B.: Przegląd sposobów leczenia propolisem chorób ginekologiczno-położniczych i proktologicznych. *Postępy fitoterapii* 2008, 1, 37-46.
9. Kędzia B., Kędzia A., Dudko P., Hołderna-Kędzia E.: Działanie propolisu krajowego na drobnoustroje chorobotwórcze pochodzące od ludzi i zwierząt. *Postępy fitoterapii*, 2009, 2, 98-105.
10. Burdock G.A.: Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem. Toxicol.* 1998, 36, 347-363.
11. Banskota A.H., Tezuka Y., Kadota S.: Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res.* 2001 Nov;15(7):561-71.
12. Fisher A.A.: Dermatitis in a musician. Part I: Allergic contact dermatitis. *Cutis*, 1998, 62(4), 167-168.
13. Gambichler T., Boms S., Freitag M.: Contact dermatitis and other skin conditions in instrumental musicians. *BMC Dermatol.*, 2004, 4(1), 3.
14. Gliński W., Rudzki E.: *Alergologia dla lekarzy dermatologów*. Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o., Lublin 2002, 192-196.
15. Rudzki E.: *Alergia na leki z uwzględnieniem odczynów anafilaktoidalnych i idiosynkrazji*. Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o., Lublin 2002, 359-361.

16. Münstedt K., Kalder M.: Contact allergy to propolis in beekeepers. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2009 Nov-Dec;37(6):298-301.
17. Münstedt K., Hellner M., Hackethal A.: Contact allergy to propolis in beekeepers. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2007 May-Jun;35(3):95-100.
18. Castaldo S., Capasso F.: Propolis, an old remedy used in modern medicine, *Fitoterapia*, 2002, 73(Suppl. 1), 1-6.
19. Hrytsenko V.I., Tykhonov O.I., Pryakhin O.R.: Study of the polysaccharide preparation propolis. *Farmatsevychnyi Zhurnal*. 1977, 32, 92-93.
20. Luan J., Wang N., Tian L.: Study on the pharmacological effect of propolis. *Zhong Yao Cai*. 2000, 23(6), 346-348.
21. Walgrave S.E., Warshaw E.M., Glesne L.A.: Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis* 2005; 16: 209-215.
22. Bogdaszewska-Czabanowska J., Szwarz K., Dembińska B.: Allergological studies on the sensitizing properties of propolis. *Przegl Dermatol*. 1980;67(6):747-52.
23. Dalben-Dota K.F., Faria M.G., Bruchi M. L., Peloso S. M., Lopes-Consolaro M. E., Svidzinski T. I.: Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. *J. Alter. Complement. Med*. 2010, 16(3), 285-290.
24. Hołderna E., Kędzia B.: Investigation upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on *Candida albicans*. *Herba Pol*. 1987, 33, 145-151.
25. De Vecchi E., Drago L.: Propolis' antimicrobial activity: what's new? *Infez. Med*. 2007, 15(1), 7-15.
26. Melliou E., Chinou I.: Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. *Planta Med.*, 2004, 515-519.
27. Ota C., Unterkircher C., Fantinato V., Shimizu M. T.: Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, 2001, 44(9-10), 375-378.
28. Dalben-Dota K.F., Lopes-Consolaro M. E., Svidzinski T. I., Bruchi M. L.: Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal Candidiasis. *eCAM* 2010; 1- 8.
29. Imhof M., Lipovac M., Kurz Ch., Barta J., Verhoeven H.C., Huber J.C.: Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. *Int. J. Gynecol. Obstetrics*, 2005, 89, 127-132.
30. Xu B. H., Shi M. Z.: An in vitro test of propolis against *Trichomonas vaginalis*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Ji Sheng Bing Za Zhi*. 2006, 24(6), 477-478.

31. Santana Perez E., Lugones Bottell M., Perez Stuart O., Castillo Brito B.: Vaginal parasites and acute cervicitis: local treatment with propolis. *Rev. Cubana Enferm.*, 1995, 11(1), 51-56.
32. Starzyk J., Scheller S., Szaflarski J., Moskwa M., Stojko A.: Biological properties and clinical application of propolis. II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneim.-Forsch.* 1977, 27(6), 1198-99.
33. Serkedjieva J., Manolova N.: Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *J. Natural Products*, 1992, 55(3), 294-297.
34. Harish Z., Rubinstein A., Golodner M., Elmaliah M., Mizrachi Y.: Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drug Exptl. Clin. Res.*, 1997, 23, 89-96.
35. Vynograd N., Vynograd I. Sosnowski Z.: A comparative multi-centre study of efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV), *Phytomedicine*, 2000, 7(1), 1-6.
36. Naito Y., Yasumuro M., Kondou K., Ohara N.: Antiinflammatory effect of topically applied propolis extract in carrageenan-induced rat hind paw edema. *Phytother. Res.* 2007, 21, 452-456.
37. Paulino N., Teixeira C., Martins R., Scremin A., Abreu S.R.L., de Castro S.L., Marcucci M. C., Dirsch V. M., Vollmar A. M.: Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian greek propolis. *Planta Medica* 2006, 72, 899-906.
38. Sosa S., Bornancin A., Tubaro A., Della Loggia R.: Topical antiinflammatory activity of an innovative aqueous formulation of Actichelated Propolis vs two commercial propolis formulations. *Phytother. Res.* 2007, 21, 823-826.
39. Hu F., Hepburn H. R., Li Y., Chen M., Radloff S. E., Daya S.: Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100(3), 276-283.
40. Rossi A., Ligresti A., Longo A., Russo A., Borreli F., Sautebin L.: The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine* 2002, 9, 530-535.
41. Michaulart P., Masferrer J.L., Carothers A.M., Subbaramaiah K., Zweifel B.S., Koboldt C., Mestre J.R., Grunberger D., Sacks P.G., Tanabe T., Dannenberg A.J.: Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model. *Cancer Res.* 1999, 59, 2347-2352.

42. Rossi A., Longo R., Russo A., Borrelli F., Sautebin L.: The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, 2002, 73(Suppl. 1), 30-37.
43. Orban Z., Mitsiades N., Burke T.R. Jr., Tsokos M., Chrousos G.P.: Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation. *Neuroimmunomodulation*, 2000, 7(2), 99-105.
44. Natorajan K., Singh S., Burke T.R., Grunberger D.: Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 9090-9095.
45. Song Y. S., Park E-H., Hur G. M., Ryu Y. S., Kim Y. M., Jin Ch.: Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *J. Ethnopharmacol.* 2002, 80, 155-161.
46. Krauze-Baranowska M.: Badania aktywności biologicznej propolisu. *Panacea* 2007, 3(20), 24-25.
47. Márquez N., Sancho R., Macho A., Calzado M. A., Fiebich B. L., Muñoz E.: Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF- κ B transcription factors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004, 308(3), 993-1001.
48. Tan-No K., Nakajima T., Shoji T., Nakagawasai O., Nijjima F. i wsp.: Anti-inflammatory effect of propolis through inhibition of nitric oxide production on carrageenin-induced Mouse paw edema. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29(1), 96-99.
49. De Campos R.O., Paulino N., da Silvia C.H., Scremin A., Calixto J.B.: Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 1998, 50(10), 1187-1193.
50. McLennan S.V., Bonner J., Milne S. i wsp.: The anti-inflammatory agent propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. *Wound Rep. Reg.* 2008, 16, 706-713.
51. Olczyk P., Wojtyczka R., Stojko J., Komosińska-Vassev K., Winisz-Szczotka K., Kuźnik-Trocha K., Koźma E.M., Olczyk K.: Porównanie przeciwbakteryjnej aktywności soli srebrowej sulfadiazyny i maści propolisowej w gojeniu doświadczalnych ran oparzeniowych. *Farmaceutyczny Przegląd Naukowy*. 2007, IV (VIII), 6, 36-43.
52. Ozturk F., Kurt E., Cerci M., Emiroglu L., Inan U., Turker M., Illker S.: The effect of propolis extract in experimental corneal injury. *Ophthalmic Res.*, 2000, 32(1), 13-18.
53. Stojko A., Scheller S., Szwarnowiecka I., Tustanowski J., Ostach H., Obuszko Z.: Biological properties and clinical application of propolis. VII. Experimental observation on

- the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on the regeneration of bone tissue. *Arzneim.-Forsch.* 1978, 28, 35-37.
54. Kabała-Dzik A., Stojko R., Szafarska-Stojko E., Wróblewska-Adamek I., Stojko A., Stojko J., Stawiarska-Pięta B.: The influence of propolis balsam on the healing process of experimentally induced burn wounds. *Ann. Acad. Siles.* 2004, 58, 2, 111-115.
55. Hosnuter M., Gurel A., Babuccu O., Armutcu F., Kargi E., Isikdemir A.: The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns*, 2004, 30(2), 121-125.
56. Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T.: Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 2004, 84, 329-339.
57. Wang T., Chen L., Wu W., Long Y., Wang R.: Potential cytoprotection: antioxidant defence by caffeic acid phenethyl ester against free radical-induced damage of lipids, DNA, and proteins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2008, 86(5), 279-287.
58. Russo A., Longo R., Vanella A.: Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenylethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, 2002, 73, 21-29.
59. Oršolić N., Bašić I.: Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomed. Pharmacother.* 2005, 59(10), 561-570.
60. Oršolić N., Benković V., Horvat-Knezević, Kopjar N., Kosalec I., Bakmaz M., Mihaljčić Z., Bendelja K., Basić I.: Assessment by survival analysis of the radioprotective properties of propolis and its polyphenolic compounds. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, 30(5), 946-951.
61. Katalinić V., Radić S., Ropac D., Mulić R., Katalinić A.: Antioxidative activity of propolis from Dalmatia (Croatia). *Acta Med. Croatica.* 2004, 58(5), 373-376.
62. Scheller S., Gazda G., Krol W., Czuba Z., Zajusz A., Gabrys J., Shani J.: The ability of ethanolic extract of propolis (EEP) to protect mice against gamma irradiation. *Z. Naturforsch.* 1989, 44(11-12), 1049-1052.
63. Sa-Nunes A., Faccioli L. H., Sforcin J. M.: Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *J. Ethnopharmacol.* 2003, 87, 93-97.
64. Sforcin J. M.: Propolis and the immune system: a review. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 113(1), 1-14.
65. Bhadauria M., Nirala S.K., Shukla S.: Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. 2008, 46(8), 2703-2712.

66. El-Khatib A.S., Agha A.M., Mahran L.G., Khayyal M.T.: Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity *in vivo*. *Z. Naturforsch.* 2002, 57c, 379-385.
67. Nirala S.K., Bhadauria M.: Propolis reverses acetaminophen induced acute hepatorenal alterations: a biochemical and histopathological approach. *Arch. Pharm. Res.* 2008, 31(4), 451-461.
68. Nirala S.K., Bhadauria M.: Synergistic effects of ferritin and propolis in modulation of beryllium induced toxicogenic alternations. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46(9), 3069-3079.
69. Nirala S.K., Bhadauria M., Shukla S., Agrawal O.P., Mathur A., Li PQ, Mathur R.: Pharmacological intervention of tiferron and propolis to alleviate beryllium-induced hepatorenal toxicity. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008, 22(4), 403-415.
70. Albukhari A.A., Gashlan H.M., El-Beshbishy H.A., Nagy A.A., Abel-Naim A.B.: Caffeic acid phenethyl ester protects against tamoxifen-induced hepatotoxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2009, 47(7), 1689-95.
71. De Barros M.P., Lemos M., Maistro E.L., Leite M.F., Barreto Sousa J.P., Bastos J.K., de Andre S.F.: Evaluation of antiulcer of the main phenolic acids found in Brazilian green propolis. *J. Ethnopharm.* 2008, 120, 372-377.
72. De Barros M.P., Sousa J.P., Bastos J.K., de Andrade S.F.: Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol.* 2007, 110(3), 567-571.
73. Abdel-Latif M.M., Windle H.J., Homasany B.S.El., Sabra K., Kelleher D.: Caffeic acid phenethyl ester modulates *Helicobacter pylori*-induced nuclear factor-kappa B and activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 2005, 146, 1139-1147.
74. El-Khawaga O.A., Salem T.A., Elshal M.F.: Protective role of Egyptian propolis against tumor in mice. *Clin. Chim. Acta*, 2003, 338(1-2), 11-6.
75. Oršolić N., Bašić I.: Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *J. Ethomarmacol.*, 2003, 84, 265-273.
76. Oršolić N., Kosalec I., Bašić I.: Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumor. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28(4), 694-700.
77. Oršolić N., Terzić S., Mihaljević Z., Sver L., Bašić I.: Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28(10), 1928-1933.

78. El-Sayed el-SM, Abo-Salem O. M., Aly H. A., Manosour A. M.: Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2009, 22(2), 168-174.
79. Kędzia B.: Toksyczność i działanie alergizujące propolisu, *Postępy Fitoterapii* 2011, 4, 282-291.
80. Hausen B.M., Wollenweber E., Senff H., Post B.: Propolis allergy. (I). Origin, properties, usage and literature review. *Contact Dermatitis.* 1987 Sep;17(3):163-70.
81. Hausen B.M., Wollenweber E., Senff H., Post B.: Propolis allergy. (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis.* 1987 Sep;17(3):171-7.
82. Hausen B.M., Wollenweber E.: Propolis allergy. (III). Sensitization studies with minor constituents. *Contact Dermatitis.* 1988 Oct;19(4):296-303.
83. Hausen B.M., Evers P., Stüwe H.T., König W.A., Wollenweber E.: Propolis allergy (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. *Contact Dermatitis.* 1992 Jan;26(1):34-44.
84. Rudzki E., Grzywa Z.: Dermatitis from propolis. *Contact Dermatitis.* 1983 Jan;9(1):40-5.
85. Hsu C.Y., Chiang W.C., Weng T.I., Chen W.J., Yuan A.: Laryngeal edema and anaphylactic shock after topical propolis use for acute pharyngitis. *Am J Emerg Med.* 2004 Sep;22(5):432-3.
86. Celikel S., Karakaya G., Yurtsever N., Sorkun K., Kalyoncu A.F.: Bee and bee products allergy in Turkish beekeepers: determination of risk factors for systemic reactions. *Allergol Immunopathol (Madr).* 2006; 34: 180-184.
87. Gulbahar O., Ozturk G., Erdem N., Kazandi A.C., Kokuludag A.: Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005; 94: 509-511.
88. Garrido Fernández S., Arroabarren Alemán E., García Figueroa B.E., Goienetxe Fagoaga E., Olaguibel Rivera J.M., Tabar Purroy A.I.: Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers. *Contact Dermatitis* 2004; 50: 320-321.
89. Bousquet J., Menardo J.L., Michel F.B.: Allergy in beekeepers. *Allergol Immunopathol (Madr).* 1982; 10: 395-398.
90. Illg J., Sanokowska E.: Allergo-toxic occupational dermatitis among beekeepers in the Kraków Province. *Przegl Dermatol.* 1976;(6 Suppl):135-7.

91. Kieć-Świerczyńska M., Kręcisz B., Świerczyńska-Machura D.: Most frequent causes of allergic contact dermatitis in farmers: based on material collected in the Nofer Institute of Occupational Medicine, Łódź. *Med Pr.* 2003;54(3):237-43.
92. Śpiewak R.: Occupational dermatoses among Polish private farmers, 1991-1999. *Am J Ind Med.* 2003;43(6):647-55.
93. Kleinhans D.: Airborne contact dermatitis due to propolis. *Contact Dermatitis* 1987; 17: 187-188.
94. Tobin A.M., Kirby B.: Airborne contact dermatitis induced by a neighbour's beehives. *Contact Dermatitis* 2003; 49: 214-215.
95. Basista K.: Direct and airborne contact dermatitis in a beekeeper from the Małopolska region. *Int J Occup Med Environ Health.* 2012, 25(4).
96. Wöhrl S., Hemmer W., Focke M., Götz M., Jarisch R.: The significance of fragrance mix, balsam of peru, colophony and propolis as screening tools in the detection of fragrance allergy. *Br. J. Dermatol.* 2001, 145, 268-273.
97. Hegyi E., Suchy V., Nagy M.: Propolis allergy (Zur Frage der Propolisallergie). *Hautarzt.* 1990 Dec;41(12):675-9.
98. Backer K., Temesvari E., Nemeth I.: Patch testing with fragrances mix and its constituents in a Hungarian population. *Contact Dermatitis.* 1994 Mar;30(3):185-6.
99. Hausen B.M.: Evaluation of the main contact allergens in propolis (1995 to 2005), *Dermatitis.* 2005 Sep;16(3):127-9.
100. Machackova J.: The incidence of allergy to propolis in 605 patients patch tested in Prague. *Contact Dermatitis.* 1988 Apr;18(4):210-2.
101. Petersen H.: Hypersensitivity to propolis. *Contact Dermatitis.* 1977 Oct;3(5):278-9.
102. Giusti F.: Sensitization to propolis in 1255 children undergoing patch testing. *Contact Dermatitis.* 2004 Nov-Dec;51(5-6):255-8.
103. Seidenari S., Giusti F., Pepe P., Mantovani L.: Contact sensitization in 1094 children undergoing patch testing over a 7-year period. *Pediatr Dermatol.* 2005 Jan-Feb;22(1):1-5.
104. Rajpara S.: The importance of propolis in patch testing – a multicentre survey. *Contact Dermatitis.* 2009 Nov;61(5):287-90.
105. Bauer A.: Allergic contact dermatitis in patients with anogenital complaints. *J Reprod Med.* 2000 Aug;45(8):649-54.
106. Kügler K., Brinkmeier T., Frosch P.J., Uter W.: Anogenital dermatoses – allergic and irritative causative factors Analysis of IVDK data and review of the literature. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2005 Dec;3(12):979-86.

107. Gregorius A., Śpiewak R.: Porównanie wyników testów płatkowych z zastosowaniem Europejskiej Serii Podstawowej, Polskiej Serii Podstawowej oraz rozszerzonej serii autorskiej w diagnostyce chorych z podejrzeniem alergii kontaktowej. *Alergoprofil* 2011, 7(3):25-31.
108. Menniti-Ippolito F., Mazzanti G., Vitalone A., Firenzuoli F., Santuccio C.: Surveillance of suspected adverse reactions to natural health products: the case of propolis. *Drug Saf.* 2008;31(5):419-23.
109. Jung W.K., Lee D.Y., Choi Y.H., Yea S.S., Choi I., Park S.G., Seo S.K., Lee S.W., Lee C.M., Kim S.K., Jeon Y.J., Choi I.W.: Caffeic acid phenethyl ester attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine model of ovalbumin-induced asthma. *Life Sci.* 2008 Mar 26;82(13-14):797-805.
110. Khayyal M.T., el-Ghazaly M.A., el-Khatib A.S., Hatem A.M., de Vries P.J., el-Shafei S., Khattab M.M.: A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003 Feb;17(1):93-102.
111. Czarnobilska E., Obtulowicz K., Dyga W., Śpiewak R.: The most important contact sensitizers in Polish children and adolescents with atopy and chronic recurrent eczema as detected with the extended European Baseline Series. *Pediatr Allergy Immunol.* 2011 Mar;22(2):252-6.
112. Czarnobilska E., Obtulowicz K., Śpiewak R.: Występowanie objawów wyprysku kontaktowego u dzieci i młodzieży szkolnej na podstawie badań ankietowych przeprowadzonych w krakowskich szkołach w latach 2007-2009. *Alergologia Immunologia* 2010; 7:24-29.
113. Kieć-Świerczyńska M., Kręcisz B., Chomiczewska D., Sobala W.: Trends in allergy to the 10 most frequent contact allergens in patients examined at the Nofer Institute, Łódź, Poland in 1996-2009. *Post Dermatol Alergol* 2012; 29,1:19-24.
114. Czarnecki R.: Farmakologia propolisu. Ocena dermatologiczna, histologiczna, cytomorfologiczna i histoenzymatyczna. Apipol-Farma, Myślenice, 1992
115. Arvouet-Grand A., Lejeune B., Bastide P., Pourrat A., Legret P. i wsp. : Propolis extract. Part 6. Subacute toxicity and cutaneous primary irritation index. *J. Pharm, Belg.*, 1993, 48, 165-170.
116. Kędzia B., Jankowiak J., Mścisz A. i wsp.: Badania nad standaryzacją ekstraktów etanolowych z propolisu. XXXV Nauk Konf Pszczel, Puławy, 1998; 3:278-9.

117. Ledón N., Casacó A., González R., Bracho J., Rosado A.: Assessment of potential dermal and ocular toxicity and allergic properties of an extract of red propolis. *Arch Dermatol Res.* 2002; 293(11):594-6.
118. Basista K.M., Filipek B.: Allergy to propolis in Polish beekeepers. *Postęp Derm Alergol* 2012; 29, 6: 440-445.
119. Gerberick G.F., Ryan C.A., Dearman R.J., Kimber I.: Local lymph node assays (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods*, 2007;41, 54-60.
120. Śpiewak R.: Alergia kontaktowa - diagnostyka i postępowanie. *Alergia Astma Immunolog.* 2007; 12(3), 109-127.
121. Saint-Mezard P., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J.F.: The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol.* 2004;14:131-8.
122. Taniguchi K., Yamamoto S., Hitomi E., Inada Y., Suyama Y., Sugioka T., Hamasaki Y.: Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2013;23(6):428-34.
123. Farhadi L., Mohammadi-Motlagh H.R., Seyfi P., Mostafaie A.: Low Concentrations of Flavonoid - Rich Fraction of Shallot Extract Induce Delayed - Type Hypersensitivity and TH1 Cytokine IFN γ Expression in BALB/c Mice. *Int J Mol Cell Med.* 2014 Winter;3(1):16-25.
124. Grabbe S., Schwarz T.: Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunologu today.* 1998, 19(1), 37-43.
125. Kieć-Świerczyńska M.: Zasady diagnostyki, orzecznictwa i profilaktyki chorób zawodowych skóry. Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, 2010, 15-25.
126. Kimber I., Basketter D.A., Gerberick G.F., Dearman R.J.: Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology.* 2002; 2, 201-211.
127. Magnusson B., Kligman AM.: The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J Invest Dermatol.* 1969; 52(3):268-76.
128. Kligman A.M, Basketter D.A.: A critical commentary and updating of the guinea pig maximization test. *Contact Dermatitis.* 1995 Mar;32(3):129-34.
129. Fiume M.M., Bergfeld W.F., Belsito D.V. Hill R.A., Klaassen C.D., Liebler D., Marks J.G. Jr, Shank R.C., Slaga T.J., Snyder P.W., Andersen F.A.: Safety assessment of propylene glycol, tripropylene glycol and PPGs as used in cosmetics. *Int J Toxicol.* 2012 Sep-Oct;31(5 Suppl):245S-60S.

130. Maurer T.: Guinea pigs hypersensitivity testing. *Methods*. 2007; 41: 48-53.
131. OECD Test No. 406: Skin Sensitisation, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, 1992.
132. Angelini G.: Topical drugs. In: Rycroft R.J.G., Menné T., Frosch P.J., Benezra C. (eds): *Textbook of contact dermatitis*. Berlin: Springer-Verlag, 1992: 490.
133. Burden A.D., Beck M.H.: Contact hypersensitivity to topical corticosteroids. *Br. J. Dermatol.*, 1992, 127:497.
134. Dooms-Gossens A. et al.: Corticosteroid contact allergy: an EECDRG multicentre study. *Contact Dermatitis*. 1996, 35:40.
135. Menné T., Christopherson J., Green A.: Epidemiology of nickel dermatitis. In: Maibach H.I., Menné T. (eds): *Nickel and the skin: immunology and toxicology*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 1989: 109-116.