

# Badanie interakcji kurkumy i etanolu w modemu embrionalnym zebrafish

Praca magisterska wykonana w Zakładzie Toksykologii i Bromatologii  
 Autor- mgr. Sylwia Giziewicz  
 Opiekun naukowy pracy - dr Anna Małkowska  
 Promotor - prof. dr hab. Ireneusz Piotr Grudziński

## Wstęp

Nadużywanie alkoholu stanowi globalny problem, prowadzący do poważnych konsekwencji zdrowotnych, w tym zaburzeń niedorozwojowych u dzieci. W poszukiwaniu substancji o terapeutycznym działaniu zwrócono uwagę na kurkumę, zioło i przyprawę stosowaną od wieków w medycynie tradycyjnej. Współcześnie kurkuma jest obecna prawie w każdym domu i dodawana do wielu potraw, jej interakcje z alkoholem nie są nadal do końca poznane a informacje dostępne w literaturze są sprzeczne. W celu szybkiego i etycznego badania toksyczności substancji najchętniej wykorzystywane są modele komórkowe lub modele zwierzęce o krótkim etapie rozwojowym, np. model zebrafish.

## Cel pracy

Celem pracy magisterskiej jest przedstawienie interakcji zachodzących pomiędzy kurkumą (*Curkuma longa*) a etanolem, poprzez zbadanie efektu wywieranego na embriony Danio pęgowanego narażone na działanie 1,5% etanolu oraz wybranych stężeń roztworów kurkumy.

## Materiały i metody

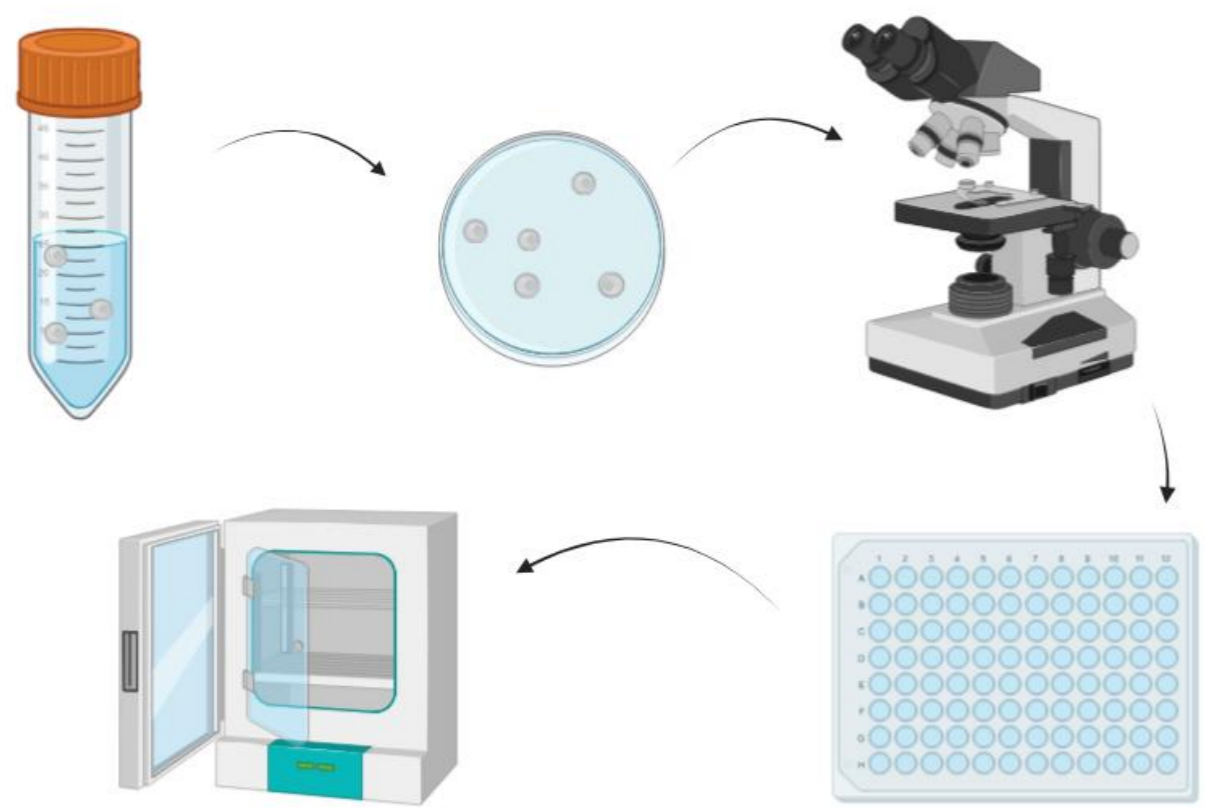
W przedstawianej pracy użyto zapłodnionych embrionów danio pęgowanego pochodzącego z Pracowni Hodowli Ryb Międzynarodowego Instytutu Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Jako badane substancje wykorzystano roztwory alkoholu etylowego, kurkumy oraz ich mieszaniny w wybranych stężeniach. Pozyskane embriony przechodziły proces selekcji i były umieszczane pojedynczo na płytkach 96-dółkowych wraz z odpowiednimi roztworami substancji i przenoszone do cieplarki.

## Mieszanina 1,5% etanolu z kurkumą

Wyniki zaobserwowanych zmian przy 1,5% etanolu z odpowiednimi stężeniami roztworów kurkumy przedstawiono w Tabeli 3. Największy procent przypadków letalnych zaobserwowano przy stężeniu 1,5% EtOH + 10 µg/ml, porównując uszkodzenia embrionów w grupach można zauważyć tendencje rosnącą wraz ze wzrostem stężenia kurkumy.

| Stężenie etanolu               | kurkumy [µg/ml] | z | 1,5% | 0,00   | 0,25   | 0,5    | 1      | 5      | 10     |
|--------------------------------|-----------------|---|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Liczebność                     |                 |   | 30   | 30     | 30     | 30     | 30     | 30     | 13     |
| Koagulacja                     |                 |   | -    | 1      | -      | -      | -      | -      | 1      |
| Brak bicia serca               |                 |   | -    | 2      | 4      | 5      | 3      | 3      | 3      |
| Obrzęk osierdzia               |                 |   | 17   | 22     | 28     | 23     | 23     | 10     | 10     |
| Obrzęk żółtka                  |                 |   | 1    | 3      | 6      | 8      | 4      | 5      | 5      |
| Zakrzywienie ogona             |                 |   | 1    | 3      | 6      | 6      | 7      | 3      | 3      |
| Opuszczenie chorionu do 72 hpf |                 |   | 90%  | 73,33% | 66,66% | 66,66% | 73,33% | 76,92% | 76,92% |
| Przeżywalność                  |                 |   | 100% | 93,33% | 86,66% | 83,33% | 90%    | 76,92% | 76,92% |

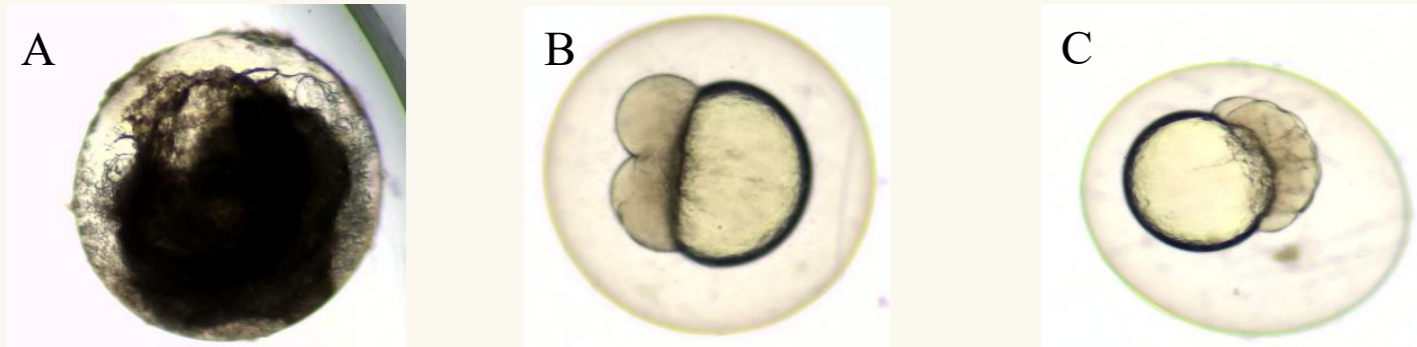
Tabela 3. Podsumowanie powstałych zmian po narażeniu na poszczególne stężenia kurkumy i etanolu



Rysunek 1. Uproszczony schemat selekcji



Zdjęcie 7-9. Obrzęki serca i żółtka w 48 hpf (A) i 72 hpf (B)



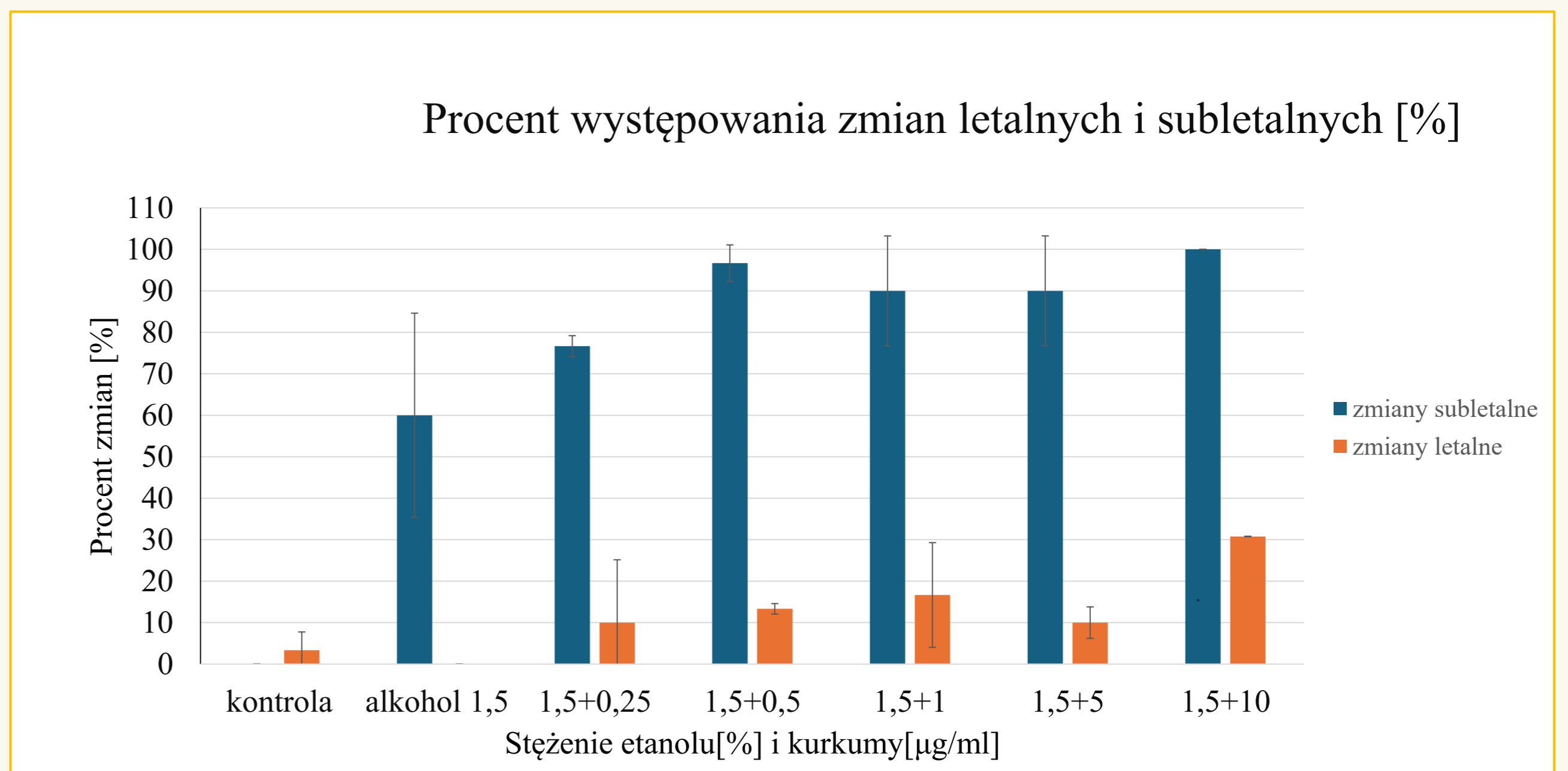
Zdjęcie 1-3. Wczesne etapy rozwoju danio rerio. A - koagulacja, B - prawidłowy rozwój, C - zatrzymanie podziałów komórkowych

Przygotowane płytki oceniano w odstępach co 24 h, za każdym razem sprawdzając czy występują zmiany morfologiczne i czynnościowe zgodnie z wytycznymi OECD (poniżej)

|                            | Czas ekspozycji |      |      |
|----------------------------|-----------------|------|------|
|                            | 24 h            | 48 h | 72 h |
| Koagulacja                 | +               | +    | +    |
| Brak bicia serca           |                 | +    | +    |
| Brak oderwania ogona       | +               | +    | +    |
| Brak formowania somitów    | +               | +    | +    |
| Obrzęki osierdzia i żółtka |                 | +    | +    |
| Opuszczenie chorionu       |                 | +    | +    |

Tabela 1. Punkty oceny zmian letalnych i subletalnych w okresie od 24-72 hpf

Za pomocą kamery i komputera z programem EPview™ w 72 HPF wykonano pomiary szerokości i długości larw.



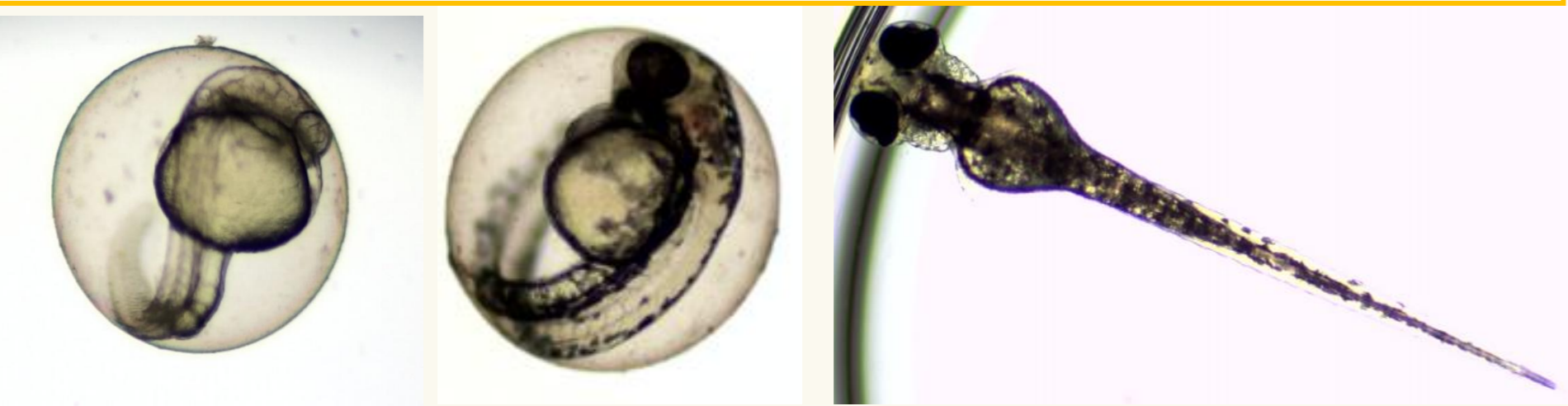
Wykres 1. Procentowy odsetek zmian letalnych i subletalnych po narażeniu na kurkumę i alkohol

W 72 od zapłodnienia wykonano pomiary długości i szerokości larw. Niestety ze względu na dużą liczbę osobników które nie opuściły chorionu i złe ułożenie embrionów, grupy poddane analizie były nierówne. Wykorzystując program Statistica przeanalizowano uzyskane dane.

## WYNIKI

### Grupa kontrolna

Grupę tę stanowiły 62 embriony umieszczone w roztworze E3, zaobserwowano jeden letalny przypadek jeszcze w pierwszej dobie po zapłodnieniu, w 72 hpf wszystkie zarodki opuściły choriony, ich rozwój przebiegał prawidłowo.



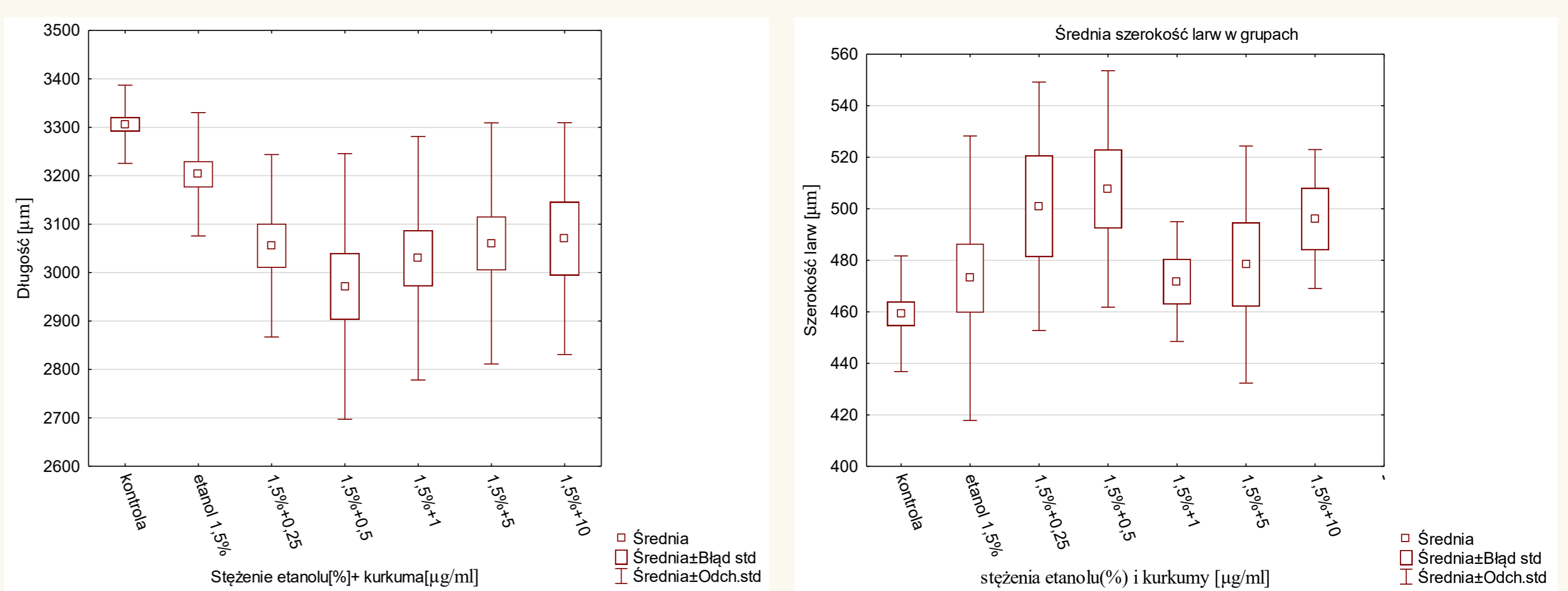
Zdjęcie 4-6. Prawidłowa budowa zarodków w: A- 24 hpf, B-48 hpf, C- 72 hpf

### Kurkuma

Aby ustalić bezpieczny zakres stężeń kurkumy, nie generujący potencjalnych dodatkowych uszkodzeń embrionów przeprowadzono dodatkowy eksperyment z wybranymi stężeniami kurkumy. W jego wyniku stężenie 20 µg/ml zostało wyeliminowane z dalszych badań.

| Stężenie kurkumy [µg/ml]       | 0,25 | 0,5  | 1    | 5    | 10   | 20   |
|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| Liczebność                     | 30   | 30   | 30   | 30   | 30   | 14   |
| Koagulacja                     | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Brak bicia serca               | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Obrzęk osierdzia               | -    | -    | -    | -    | -    | 2    |
| Obrzęk żółtka                  | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Zakrzywienie ogona             | 1    | -    | -    | -    | -    | -    |
| Opuszczenie chorionu do 72 hpf | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| Przeżywalność                  | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |

Tabela 2. Podsumowanie powstałych zmian po narażeniu na poszczególne stężenia kurkumy



Wykorzystując test ANOVA rang Kruskala-Wallisa dla pomiarów długości wykazano wystąpienie statystycznych różnic pomiędzy grupą kontrolną oraz roztworami kurkumy z alkoholem, nie wystąpiły natomiast różnice pomiędzy kontrolą negatywną a samym etanolem. W przypadku pomiarów szerokości nie zaobserwowano różnic między poszczególnymi grupami.

| Stężenie                         | Wartość 'z' dla porównań wielokrotnych; Zmn1 (Arkusze50) |           |           |           |           |           |           |
|----------------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                  | a  | b         | c         | d         | e         | f         | g         |
| E3                               | R: 104,90  | R: 76,955 | R: 50,353 | R: 45,313 | R: 50,526 | R: 57,550 | R: 54,300 |
| Etanol 1,5%                      | 2,563125   | 2,563125  | 4,621000  | 4,949085  | 4,771352  | 4,220993  | 3,557307  |
| Etanol 1,5% + Kurkuma 0,25 µg/ml | 4,621000   | 2,106035  | 2,462059  | 2,462059  | 2,157340  | 1,605682  | 1,518609  |
| Etanol 1,5% + Kurkuma 0,5 µg/ml  | 4,949085   | 2,462059  | 0,369956  | 0,369956  | 0,013277  | 0,557761  | 0,253204  |
| Etanol 1,5% + Kurkuma 1 µg/ml    | 4,771352   | 2,157340  | 0,013277  | 0,392837  | 0,392837  | 0,932762  | 0,569989  |
| Etanol 1,5% + Kurkuma 5 µg/ml    | 4,220993   | 1,605682  | 0,557761  | 0,932762  | 0,560504  | 0,560504  | 0,246944  |
| Etanol 1,5% + kurkuma 10 µg/ml   | 3,557307   | 1,518609  | 0,253204  | 0,569989  | 0,246944  | 0,214532  | 0,214532  |

Tabela 4. Porównania wielokrotne między grupami, różnice znaczące statystycznie

## WNIOSKI

- Mieszanina kurkumy i etanolu wykazuje wielokierunkowe oddziaływanie na embriony Danio pęgowanego
- Sama kurkuma w niskich stężeniach nie wykazuje efektów embriotoksycznych na embriony, natomiast zaobserwowano większą ilość zmian subletalnych i letalnych embrionów narażonych na obydwie substancje
- W badaniu zauważono istotne statystycznie różnice w długości larw w wyniku zastosowania połączenia etanolu z kurkumą względem grupy kontrolnej
- Doświadczenie nie wykazało istotnego wpływu mieszaniny etanolu i kurkumy na szerokość larw, jednak zagadnienie to wymaga dalszych badań