

Lipopolisakkarit ile uyarılmış makrofajlarda propolis'in sitokin salınımı üzerine etkileri

The effects of propolis on cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages

Esma Gündüz Kaya, Hatice Özbilge

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

ÖZET

Amaç: Propolis, çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı son yıllarda araştırmacıların ilgisini çeken bir arı ürünüdür. Lipopolisakkarit (LPS), Gram negatif bakterilerin dış membran komponenti olup, inflamatuvar sitokinlerin aşırı üretimine yol açarak septik şok ve çeşitli inflamatuvar hastalıkların patogenezinde önemli rol oynar. Bu çalışmada Kayseri ve çevresinden toplanan propolis'in etanolik ekstraktının, LPS ile uyarılmış makrofajlarda pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: İn vitro olarak, fetal bovin serum (%10) ve penisilin-streptomisin (%2) ilaveli RPMI-1640 besiyerinde üretilen U937 insan makrofaj hücreleri, kontrol, LPS uygulanan ve propolis+LPS uygulanan hücreler olmak üzere üç gruba ayrıldı. Hücrelerin 37°C ve %5 CO₂'li atmosferde inkübasyonu sonunda, hücre süpernatantlarında interlökin (IL)-1β, IL-6 ve tümör nekrozis faktör (TNF)-α düzeyleri ELISA ile ölçüldü.

Bulgular: LPS uygulanan hücre grubunda, IL-1β, IL-6 ve TNF-α düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken, LPS ve propolis uygulanan hücre grubunda -yalnız LPS uygulanan hücre grubuna göre- her üç sitokin düzeyinde de anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (p<0.05).

Sonuç: Propolis, pro-inflamatuvar sitokinlerin baskılanması gerektiği durumlarda kullanılabilecek bir ajan olarak incelenmesi gereken doğal bir üründür.

Anahtar kelimeler: Lipopolisakkarit, makrofaj, pro-inflamatuvar sitokin, propolis

GİRİŞ

Doğal ürünler, insanlar arasında binlerce yıldır birçok hastalığın tedavisinde kullanılagelmiştir. Bu doğal ürünler arasında önemli yere sahip propolis, bal arıları tarafından farklı bitki kaynaklarından toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılan bir arı ürünü-

ABSTRACT

Objectives: Propolis, a bee-product, has attracted researchers' interest in recent years because of several biological and pharmacological properties. Lipopolysaccharide (LPS) is a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria and has an important role in the pathogenesis of septic shock and several inflammatory diseases by causing excessive release of inflammatory cytokines. The aim of this study was to investigate the effects of ethanol extract of propolis collected in Kayseri and its surroundings on production of pro-inflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages.

Materials and methods: In vitro, U937 human macrophage cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (10%) and penicillin-streptomycin (2%) and divided into: control, LPS treated, and propolis+LPS treated cell groups. After incubation in an atmosphere of 5% CO₂ and at 37°C of cells, interleukin (IL)-1β, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)-α levels were measured in cell-free supernatants by ELISA.

Results: IL-1β, IL-6 and TNF-α levels increased in LPS treated cell group according to control, statistically significant. Each cytokine levels significantly decreased in LPS and propolis treated cell group according to only LPS treated cell group (p<0.05).

Conclusion: Propolis is a natural product to be examined for usage when needed the suppression of pro-inflammatory cytokines. *J Clin Exp Invest* 2011; 2 (4): 366-370

Key words: Lipopolysaccharide, macrophage, pro-inflammatory cytokine, propolis

dür. Propolis'in antibakteriyel, antiviral, antioksidan, anti-inflamatuvar ve immünmodülatör gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir.^{1,2}

Makrofajlar, konak savunma mekanizmalarını içeren doğal ve kazanılmış bağışık yanıtta önemli role sahip hücrelerdir. Fagositoz, enzim ve sitokin

Yazışma Adresi /Correspondence: Dr. Esma Gündüz Kaya

Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD. Talas, Kayseri, Türkiye Eposta: esmagkaya@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received: 10.10.2011, Kabul Tarihi / Accepted: 25.10.2011

Copyright © Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi 2011, Her hakkı saklıdır / All rights reserved

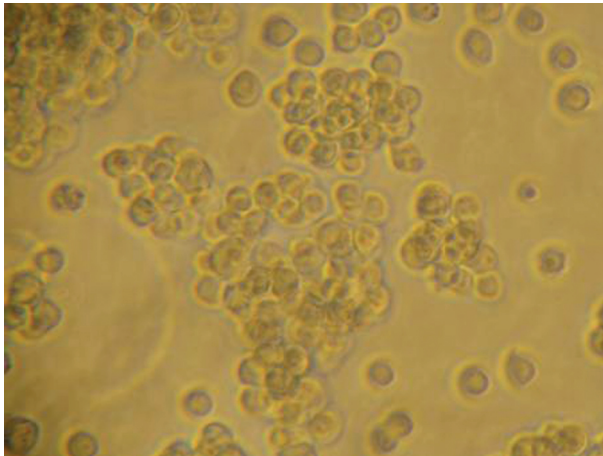
salınımı, serbest radikallerin oluşumu gibi fonksiyonlara sahip bu hücreler, konağın mikroorganizmalarla mücadelesinde vazgeçilmez yere sahiptir. Ancak makrofajların fazla aktivasyonu, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokinlerin fazla üretimi nedeniyle, hücrelerde hasara ve inflamatuvar barsak hastalıkları ve romatoid artrit gibi inflamatuvar hastalıklara yol açar.³

Propolis'in makrofajları aktive ederek nonspesifik bağışıklık sistemi üzerinde düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir.¹ Propolis'in, toplandığı bitkiye, coğrafik bölgeye, mevsime ve toplayan arı türüne bağlı olarak kimyasal bileşimi ve buna bağlı olarak biyolojik aktivitesi değişmektedir. Bu çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolis'in etanolik ekstraktının, Gram negatif bakterilerin dış membran komponenti olan lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılmış makrofajlarda pro-inflamatuar sitokinlerin üretimi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Çalışmada LGC Promochem'den elde edilen U937 insan monositik hücreleri [American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA] kullanıldı. Hücre mediyumu olarak, L-Glutamin içeren RPMI-1640 besiyeri (Sigma, USA) kullanıldı. Bu besiyeri üzerine %10 oranında inaktive edilmiş steril fetal bovin serum, 100 U/ml penisilin ve 100 μ g/ml streptomisin ilave edildi. Hücreler hazırlanan hücre mediyumunda, 37°C ve %5 CO₂'li inkübasyon şartlarında kültüre edildi, haftada üç kez pasajlanarak çoğaltması sağlandı ve düzenli olarak invert mikroskopta morfolojisi, sayısı ve canlılığı yönünden incelendi (Şekil 1). Deney için 4.-10. pasaj sayısı aralığındaki hücreler kullanıldı.



Şekil 1. Kontrol grubu makrofaj hücrelerinin invert mikroskopta görünümü (x 400 büyütme)

Propolis'in Hazırlanması

Çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolis'in etanol ile hazırlanan ekstresi kullanıldı. Steril membran filtreden süzülerek steril hale getirilen stok ekstre solüsyonundan 16-512 μ g/ml arasında ikişer kat propolis konsantrasyonları hazırlandı. Elde edilen konsantrasyonlardaki etanol içeriği %5'in altında olacak şekilde ayarlandı. Propolis'in, hücreler üzerinde toksik olmayan en yüksek konsantrasyonu belirlendi. Bu amaçla, hazırlanan her bir propolis konsantrasyonu, 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarının kuyucuklarında son konsantrasyonu 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlanan makrofaj hücreleri üzerine ayrı ayrı eklendi. Plaklar 37°C'de %5CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Her bir kuyucuktaki hücreler, inkübasyon sonunda trypan blue ile boyanarak ışık mikroskobunda canlılık oranı yönünden incelendi. Hücrelerin %80-90 oranında canlı kaldığı propolis konsantrasyonu (64 μ g/ml) deney için kullanıldı.

Deneyin Yapılışı

Hücrelerin canlılığı trypan blue ile boyanarak ışık mikroskobunda kontrol edildi. %90 oranında canlı oldukları tespit edilen hücrelerin yoğunluğu hemisitometrede sayılarak kuyucuklarda son konsantrasyonu 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı ve 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarının çalışma kuyucuklarına total hacim 1800 μ l olacak şekilde dağıtıldı. Hücrelerin makrofajlara dönüşümü için 250 ng/ml Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, USA) eklendi ve 24 saat 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildikten sonra PMA içeren mediyum çekilerek taze mediyum eklendi. İlgili kuyucuklara LPS (*Escherichia coli*, serotip O26:B6) (Sigma, USA) 10 μ g/ml konsantrasyonda uygulandı.⁴

Çalışma grupları şu şekilde belirlendi:

1. Grup: Sadece makrofaj içeren kuyucuk (M) (Kontrol grubu)
2. Grup: Makrofaj hücreleri ve LPS içeren kuyucuk (M+L)
3. Grup: Makrofaj hücreleri + LPS + Propolis içeren kuyucuk (M+L+P)

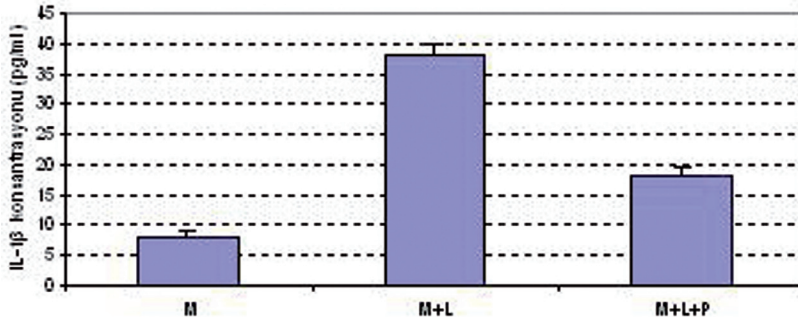
Her bir grup üçer kuyucuktan oluştu. Hücre kültür plakları 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Hücre kültür süpernatantlarında sitokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) düzeyleri, ELISA kitleri (İnvitrogen, USA) ve ELISA cihazı (Biotek, Synergy HT, USA) kullanılarak ölçüldü. Her bir grup üç kez çalışıldı. Grafikler, grupların ortalama + standart sapma değerlerine göre elde edildi.

İstatistiksel Analiz

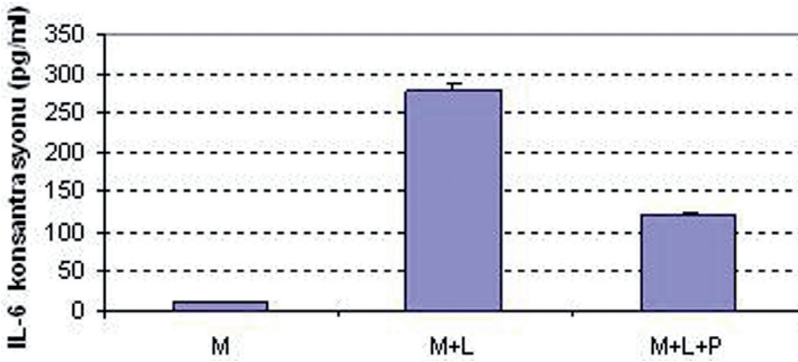
Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile değerlendirildi. Testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

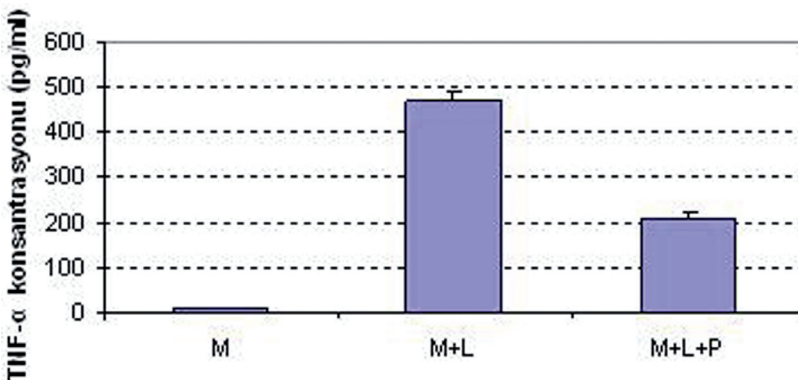
LPS uygulanan hücre grubunda, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken, LPS ve propolis uygulanan hücre grubunda -yalnız LPS uygulanan hücre grubuna göre- her üç sitokin düzeyinde de anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 2-4).



Şekil 2. Lippolisakkarit ve propolis'in U937 hücrelerinde IL-1 β üretimine etkisi (M, sadece makrofaj içeren kuyucuk; M+L, makrofaj hücreleri ve LPS içeren kuyucuk; M+L+P, makrofaj hücreleri + LPS + propolis içeren kuyucuk)



Şekil 3. Lippolisakkarit ve propolis'in U937 hücrelerinde IL-6 üretimine etkisi (M, sadece makrofaj içeren kuyucuk; M+L, makrofaj hücreleri ve LPS içeren kuyucuk; M+L+P, makrofaj hücreleri + LPS + propolis içeren kuyucuk)



Şekil 4. Lippolisakkarit ve propolis'in U937 hücrelerinde TNF- α üretimine etkisi (M, sadece makrofaj içeren kuyucuk; M+L, makrofaj hücreleri ve LPS içeren kuyucuk; M+L+P, makrofaj hücreleri + LPS + propolis içeren kuyucuk)

TARTIŞMA

Makrofajlar, hem fagositoz özelliği ile hem de çeşitli sitokinleri üreterek konak savunmasına yardımcı olur. Ancak makrofajların aşırı aktivasyonu inflammatuar sitokinlerin fazla üretimi yoluyla hücrelerde hasara ve inflammatuar hastalıklara yol açar. Bu nedenle makrofajların aşırı aktivasyonunun önlenmesi önemlidir. Makrofaj fonksiyonlarını baskılayan bileşikler üzerine yapılmış birçok çalışma rapor edilmiştir.³

Doğal bir ürün olan propolis'in, toksik etkisinin olmaması, kolay elde edilebilir olması ve geniş biyolojik aktiviteye sahip olması gibi nedenlerden dolayı tedavi amacıyla kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır. Propolis, anti-inflamatuar, immünmodülatör ve antioksidan ajan olarak son yıllarda modern tıpta dikkatleri üzerine çeken bir üründür.¹ Bu etkilerinden başlıca flavonoidler ve fenolik asitler gibi farmakolojik aktif bileşenlerinin sorumlu olduğu bildirilmektedir.⁵

Propolis'in etanolik ekstraktının fare kulak inflamasyon modelinde ve rat artrit modelinde anti-inflamatuar etki gösterdiği bildirilmiştir.^{5,6} Ayrıca in vitro olarak mürin peritoneal makrofajlardan prostaglandin ve lökotrien oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir.⁷ Blonska ve arkadaşları çalışmalarında, Propolis'in etanolik ekstraktının ve onun bazı aktif bileşenlerinin in vitro olarak LPS ile uyarılmış makrofajlardan IL-1 β ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu baskıladığını bildirmişlerdir.⁵

LPS, Gram negatif bakterilerin dış membran komponenti olup, makrofajlardan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi inflammatuar sitokinlerin salınımını indükler ve septik şok patogenezinde önemli rol oynar.^{8,9} Korish ve Arafa, bir propolis bileşeni olan kafeik asit fenetil esterinin, Wistar ratlarda LPS ile indüklenmiş endotoksemi, hepatik ve nöronal hasara karşı koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-4 ve IL-10 sitokinlerinin plazma konsantrasyonlarını ve hepatik ve nöral hücrelerde histopatolojik değişiklikleri değerlendirmişler, CAPE kullanımının inflammatuar sitokinlerde azalma ve anti-inflamatuar sitokin düzeyinde artışa yol açtığını, karaciğer ve beyin hücrelerini LPS'nin toksik etkilerinden koruduğunu göstermişlerdir.⁸

İn vitro olarak, U937 makrofajlarında LPS maruziyetinin proinflammatuar sitokin sekresyonunu artırdığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir.^{9,10} Bu çalış-

mada in vitro olarak LPS uygulanan U937 hücrelerinden, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α salınımının arttığı, LPS ile beraber propolis uygulamasının her üç sitokin düzeyinde de azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir ($p < 0.05$).

Sonuç olarak, Kayseri ve çevresinden elde edilen propolis, pro-inflamatuar sitokinlerin baskılanması gerektiği durumlarda kullanılabilecek bir ajan olarak, özellikle içerisinde bulunabilecek farmakolojik aktif bileşenleri üzerinden incelenmesi gereken doğal bir üründür.

Not

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSA-08-618 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol* 2007; 113(1): 1-14.
2. Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31(1): 3-15.
3. Jin M, Iwamoto T, Yamada K, Satsu H, Totsuka M, Shimizu M. Effects of chondroitin sulfate and its oligosaccharides on toll-like receptor mediated IL-6 secretion by macrophage-like J774.1 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2011; 75(7): 1-7.
4. Wang CZ, Zhang Y, Li XD, et al. PPAR γ agonist suppresses TLR4 expression and TNF- α production in LPS stimulated monocyte leukemia cells. *Cell Biochem Biophys* 2011; 60(2): 167-72.
5. Blonska M, Bronikowska J, Pietsz G, Czuba ZP, Scheller S, Krol W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *J Ethnopharmacol* 2004; 91(1): 25-30.
6. Park EH, Khang JH. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch Pharm Res* 1999; 22(4): 554-8.
7. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostag Leukotr Ess* 1996; 55(3): 441-9.
8. Korish AA, Arafa MM. Propolis derivative inhibit the systemic inflammatory response and protect hepatic and neuronal cells in acute septic shock. *Braz J Infect Dis* 2011; 15(4): 332-8.

9. Yasuda T. Hyaluronan inhibits akt, leading to nuclear factor- κ B down-regulation in lipopolysaccharide stimulated U937 macrophages. *J Pharmacol Sci* 2011; 115(4): 509-15.
10. Yasuda T. Hyaluronan inhibits cytokine production by lipopolysaccharide stimulated U937 macrophages through down-regulation of NF- κ B via ICAM-1. *Inflamm Res* 2007; 56(2): 246-53.