

**LEISHMANIA TROPICA İLE İNFEKTE MAKROFAJ HÜCRELERİNDE
PROPOLİSİN SİTOKİN SALINIMINA ETKİLERİ***

**The Effects of Propolis on the Levels of Cytokine on *Leishmania Tropica*
Infected Macrophage Cells**

Hatice ÖZBİLGE¹, Esmâ Gündüz KAYA²

Özet: Leishmanialar memeli konakta makrofaj hücreleri içinde amastigot, vektörde ise promastigot olarak yaşayan bir doku parazitidir. Propolis, bal arıları tarafından bitkilerden toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılan doğal bir üründür. Bu çalışmanın amacı, *Leishmania tropica* ile infekte insan makrofaj hücrelerinde interlökin (IL)-1 β , IL-6 ve IL-12 sitokin seviyelerine propolisin etkilerini araştırmaktır.

Çalışma; makrofaj (M), makrofaj+parazit (M+P) ve makrofaj+parazit+propolis (M+P+Pr) olmak üzere üç farklı grup üzerinde yapıldı. U-937 insan makrofaj hücreleri, % 10 fetal bovin serum ve % 2 penisilin-streptomisin ilaveli RPMI-1640 besiyerinde üretilerek, son konsantrasyonu 1 \times 10⁶ hücre/ml olacak şekilde 24'lük hücre kültür plaklarına dağıtıldı. *L.tropica* promastigotları, makrofaj:promastigot oranı 1:10 olacak şekilde makrofaj hücreleri üzerine ilave edildi. Makrofajlar içine giren promastigotlar, amastigot forma geçti. Son konsantrasyonu 64 μ g/ml olacak şekilde propolis ilave edildi. Plaklar %5 CO₂'li ortamda 37°C'de 24 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonunda üç ayrı grubun süpernatantlarında IL-1 β , IL-6 ve IL-12 sitokin seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. IL-12 sitokin seviyesi M+P+Pr grubunda diğer iki gruba göre daha yüksek bulundu (p<0.05). IL-1 β ve IL-6 sitokin seviyeleri propolis uygulanan grupta M+P grubuna göre daha düşük bulundu (p<0.05).

Bu çalışma, propolisin *L.tropica* ile infekte makrofaj hücrelerinde IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinin baskılanmasına ve IL-12 seviyesinin artmasına sebep olduğunu ve böylece immün yanıtı desteklediğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *L.tropica*, makrofaj, propolis, sitokin

Abstract: *Leishmania*, a tissue parasite, live in macrophage cells in the mammalian host as amastigote, in vector as promastigote. Propolis, collected from plants by bees and hives in mixed wax is a natural product used for many purposes. The aim of this study was to investigate the effects of propolis on the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-12 cytokines on *Leishmania tropica* infected human macrophage cells.

This study was performed on three different groups of macrophage (M), macrophage+parasite (M+P), and macrophage+parasite+propolis (M+P+Pr). U-937 human macrophage cells were grown in RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 2 % penicillin-streptomycin. The final cell concentration as 1 \times 10⁶ cells/ml were dispended in 24-well cell culture plates. *L.tropica* promastigotes were added by a ratio of 1 macrophage cell:10 promastigotes to be on the macrophage cells. Promastigotes were entered into macrophage cells and transformed into amastigotes form. The final concentration of propolis is 64 μ g/ml were added. The plates were incubated at 37°C and in 5% CO₂ incubator for 24 hours. At the end of incubation, IL-1 β , IL-6 and IL-12 cytokine levels were measured in supernatants of the three different groups by ELISA. IL-12 cytokine levels in the M+P+Pr group were found higher than the others groups. (p<0.05). IL-1 β and IL-6 cytokine levels in the M+P+Pr group were found lower than in the M+P group (p<0.05).

This study shows that, propolis causes the supression of IL-1 β and IL-6 cytokines and the increases IL-12 cytokine levels on the *L.tropica* infected macrophage cells and this also supports the immun response.

Keywords: *L.tropica*, macrophage, propolis, cytokine

¹ Prof.Dr.Erciyes Ün.Ecz.Fak.Farmasötik Mik.AD, Kayseri

² Yrd.Dç.Dr.Erciyes Ün.Ecz.Fak.Farmasötik Mik.AD,Kayseri

Geliş Tarihi : 12.08.2011 Kabul Tarihi : 12.09.2011

***Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir
(Proje no:TSA-09-910).**

Apis mellifera olarak isimlendirilen işçi bal arılarının ağaçların kozalak ve kabuklarından, bitkilerin tomurcuk ve filizlerinden çeşitli yağları, bitki öz sularını, polenleri, özel reçine ve mumsu maddeleri toplayarak ve salgıladıkları birtakım enzimlerle bunları biyokimyasal değişikliğe uğratarak oluşturdukları propolis adı verilen doğal ürünün, antimikrobiyal ve immünstimulan etkileri olduğu bilinmektedir (1- 4).

Leishmania sp., Kinetoplastida takımında ve Trypanosomatidae ailesinde yer alan ve insan ve bazı memeli hayvanların makrofajlarında yaşayabilen bir doku parazittir. Bu parazite karşı oluşan Th₂ immün yanıt leishmaniasisin ilerlemesine sebep olurken, Th₁ immün yanıt amastigotların üremesini ve hastalığın ilerlemesini sınırlamaktadır. Makrofajlardan salınan IL-12 bu yanıtı desteklemektedir (5).

Propolisin makrofajlardan bazı sitokinlerin salınımını arttırarak veya baskılayarak immunomodülasyonda etkili olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (1, 6). Bu çalışmada, makrofaj içine yerleşmiş leishmania amastigotları üzerine uygulanan propolisin IL-1 β , IL-6 ve IL-12 sitokin salınımını üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

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

kullanıldı ve hücre yoğunluğu hemositometre kullanılarak ayarlandı.

Propolisin Hazırlanması: Çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolisin etanol ile hazırlanan ekstresi kullanıldı. Propolisin son konsantrasyonlarındaki etanol içeriği % 5'in altında olacak şekilde ayarlama yapıldı. Steril membran filtreden süzülerek steril hale getirilen stok solüsyondan 16-512 μ g/ml arasında ikişer kat propolis konsantrasyonları hazırlanarak makrofaj hücreleri için toksik doz belirlendi. Propolisin, hücreler üzerinde toksik olmayan en yüksek konsantrasyonu 64 μ g/ml olarak belirlendi ve deneyde bu konsantrasyon kullanıldı.

***Leishmania tropica*'nın Üretilmesi:** Şanlıurfa Harrankapı Şark Çıbanı merkezine başvuran kutanöz leishmaniasisli bir hastadan elde edilen ve *L. tropica* olarak tiplendirilmesi yapılmış olan bir suş çalışmada kullanıldı. Parazitin üretilmesi için % 20 FBS ilaveli RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Çalışma logaritmik üreme fazında bulunan parazitler ile gerçekleştirildi ve parazit yoğunluğu hemositometrede sayılarak ayarlandı.

Deneyin Yapılışı: Çalışma grupları şu şekilde belirlendi:

1. Grup: Sadece makrofaj içeren kuyucuk (M) (Kontrol)

2. Grup: Makrofaj hücreleri ve parazit içeren kuyucuk (M+P)

3. Grup: Makrofaj hücreleri + Parazit+ Propolis içeren kuyucuk (M+P+Pr)

Yoğunluğu hemositometrede sayılarak ayarlanmış makrofaj hücreleri 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarına dağıtıldı. *L.tropica* promastigotları, makrofaj : parazit oranı 1:10 olacak şekilde makrofajlar üzerine bırakıldı. Promastigotların makrofajlar içine girmesi ve amastigot forma geçmesi beklendi. Daha sonra kuyucuklara son hacimde 64 μ g/ml konsantrasyonda olacak şekilde propolis ilave edildi. Uygun ortamda 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre kültür süpernatantları

toplandı. ELISA kitleri (İnvitrogen, USA) ve ELISA cihazı (Biotek, Synergy HT, USA) kullanılarak üç ayrı grubun süpernatantlarında IL-1 β , IL-6 ve IL-12 sitokin seviyeleri ölçüldü. Her bir grup altı kez çalışıldı. Grafikler, grupların ortalama \pm standart sapma değerlerine göre elde edildi.

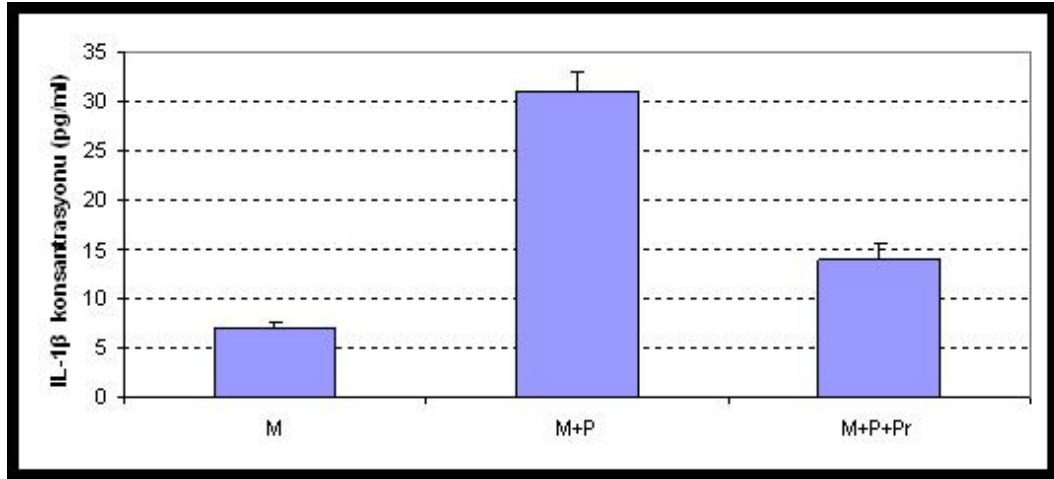
İstatistiksel Değerlendirme: Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, SPSS 15.0 istatistik programı kullanıldı. Gruplar arası anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile değerlendirildi. Testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

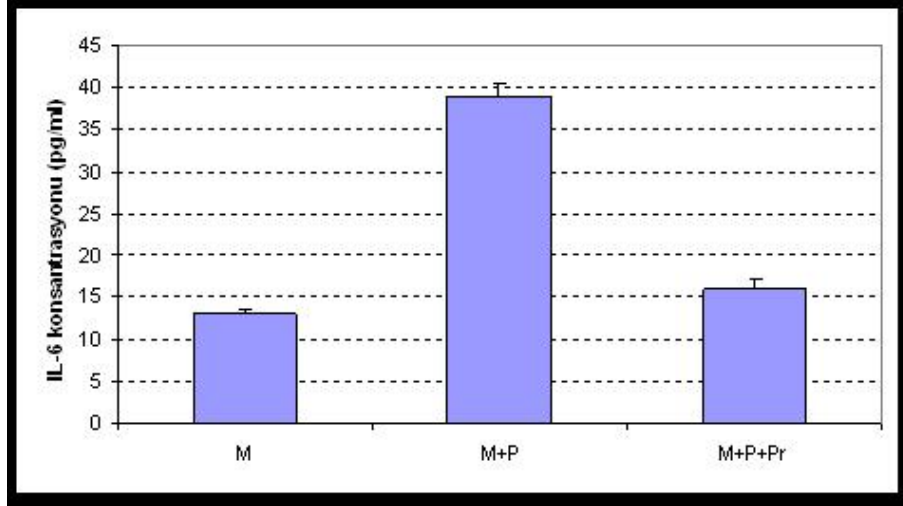
Makrofajlar üzerine parazitin verildiği grupta IL-1 β , IL-6 ve IL-12 sitokin seviyelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p < 0.05$).

Propolis uygulanan grupta (M+P+Pr), IL-1 β ve IL-6 proinflatuar sitokin seviyeleri, makrofaj+parazit grubuna göre daha düşük bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 1-2).

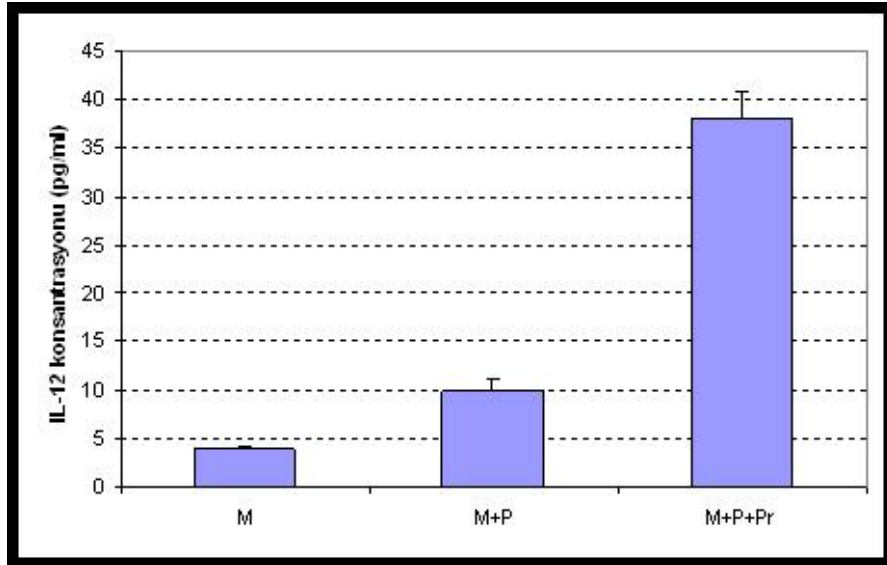
Propolis uygulanan grupta (M+P+Pr), IL-12 sitokin seviyesi hem kontrole göre, hem de makrofaj+parazit grubuna göre daha yüksek bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 3).



Şekil 1. *Leishmania tropica* ve propolisin U937 hücrelerinde IL-1 β üretimine etkisi (M, sadece makrofaj içeren kuyucuk; M+P, makrofaj hücreleri ve parazit içeren kuyucuk; M+P+Pr, makrofaj hücreleri + parazit + propolis içeren kuyucuk)



Şekil 2. *Leishmania tropica* ve propolisin U937 hücrelerinde IL- 6 üretimine etkisi (M, sadece makrofaj içeren kuyucuk; M+P, makrofaj hücreleri ve parazit içeren kuyucuk; M+P+Pr, makrofaj hücreleri + parazit + propolis içeren kuyucuk)



Şekil 3. *Leishmania tropica* ve propolisin U937 hücrelerinde IL-12 üretimine etkisi (M, sadece makrofaj içeren kuyucuk; M+P, makrofaj hücreleri ve parazit içeren kuyucuk; M+P+Pr, makrofaj hücreleri + parazit + propolis içeren kuyucuk)

TARTIŞMA

Farklı bölgelerden elde edilen propolis ekstraktlarının antileishmanial etkilerinin, propolisin toplandığı bölgeye göre değiştiği bulunmuştur. Leishmania türleri ve formları üzerine propolisin etkisinde farklılıklar olduğu gösterilmiştir (7).

Yapılan çeşitli çalışmalarda propolis ekstrelerinin makrofajlar ile infekte hücrelerde parazit miktarını azalttığı gösterilmiştir (8-10). Parazitle infekte olan makrofajlar tarafından doğal savunma mekanizması olarak bazı sitokinler salgılanmaktadır. Bu çalışmada, herhangi bir uyarı olmadığında makrofajlardan IL-1, IL-6 ve IL-12 sitokinin salınımı düşük düzeyde bulunurken, parazitlerin makrofaj içine girmesinden sonra her üç sitokinin de salınımında artış tespit edilmiştir. Bu artışın doğal bağışık yanıt sonucu oluştuğu düşünülmüştür.

Bazı araştırmacılar, makrofajlar üzerine uygulanan propolisin proinflatuar sitokinlerin salınımını arttırdığını, bazıları azalttığını, bazıları ise değiştirmedini öne sürmüşlerdir (1, 7). Yapılan bir çalışmada, makrofajların fazla uyarılmaları sonucunda IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin aşırı yükselmesinin hücrelerde hasara sebep olabileceği bildirilmiştir (6). Bu çalışmada makrofajlar içindeki amastigotlar üzerine propolis verildiğinde IL-1 β ve IL-6 seviyelerinin azaldığı görülmüştür. Doğal immün yanıt olarak makrofajların proinflatuar sitokinleri arttırmasına karşılık bu doğal immün yanıtın hasarını azaltmak için propolisin proinflatuar sitokin seviyelerini azalttığı düşünülmüştür.

Bazı araştırmacılar, makrofajlar üzerine uygulanan propolisin, makrofajlardan IL-12 gibi sitokinlerin salınımını artırarak doğal katil hücrelerin sitotoksik aktivitelerini arttırdığını belirtirken, bazı araştırmacılar ise karşı yönde görüş belirtmişlerdir (1, 7). Bu çalışmada propolis ilave edilen grupta IL-12 seviyelerinde artış olması ilk görüşü destekler nitelikte değerlendirilmiştir.

Çalışmada, parazit uyarımı ile makrofajlar tarafından salınımı artırılan IL-1 β ve IL-6 sitokinlerinin propolis ilavesi sonrasında salınımlarının baskılandığı, böylece proinflatuar sitokinlerin aşırı salınımından hücrelerin korunduğu, Th₁ yanıtının bir göstergesi olan IL-12 sitokin seviyesinin propolis verilen grupta yükseldiği, böylece parazitin elimine edilmesini sağlayan hücresel immün yanıtı destek olunduğu sonucuna ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Sforcin JM. *Propolis and the immune system: a review. J Ethnopharmacol* 2007; 113:1-14.
2. Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC, Güney C. *Önemli bir arı ürünü: Propolis. Uludağ Arıcılık Dergisi* 2002; 23:10-23.
3. Marcucci MC. *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie* 1995; 26:83-99.
4. Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie* 2000; 31:3-15.
5. Pearson RD, Sousa QA. *Leishmania species: Visceral (kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York 1995, pp 2428-2442.*
6. 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; 75:1-7.

7. De Carvalho Machado GM, Leonor LL, De Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:73-77.
8. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effect of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Rio Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102:215-220.
9. Ozbilge H, Kaya EG, Albayrak S, Silici S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4:556-560.
10. Pontin K, Filho ADSA, Santos FF, et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* 2008; 103:487-492.