

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**PROPOLİSİN U-937 MAKROFAJLARINDA OKSİDATİF STRESE VE
SİTOKİN SALINIMINA ETKİLERİ**

Proje No: TSA-08-618

Normal Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Esmâ KAYA
Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacılar
Prof. Dr. Hatice ÖZBİLGE
Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Mükerrrem Betül YERER
Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı
Songül ALBAYRAK
Kurum Dışı Öğrenci

Mayıs 2014

KAYSERİ

TEŐEKKÜR

Propolisin temini ve etanolik ekstresinin hazırlanmasını sağlayarak çalıŐmaya bŸyŸk katkı sağlayan Erciyes Ÿniversitesi Safiye ıkırıkıoğlu Meslek YŸksekokulu Őđretim Ÿyesi Prof. Dr. Sibel SİLİCİ' ye teŐekkŸr ederim. Bu projenin gerçekleŐtirilmesinde desteklerinden dolayı Erciyes Ÿniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teŐekkŸrlerimi sunarım.

Doç. Dr. Esmā KAYA
Proje YŸrŸtŸcŸsŸ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	7
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Propolis Hakkında Genel Bilgiler	8
2.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri	9
2.3. Propolisin Kimyasal İçeriği	10
2.4. Propolisin İnsanlar Tarafından Kullanılması	10
2.5. Propolisin İmmün Sistem Üzerine Etkileri	12
2.5.1. Propolisin Makrofajlar Üzerine Etkileri	12
2.5.2. Propolisin Lenfositlere ve Antikor Üretimine Etkileri	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Çalışmada Kullanılan Tampon, Solüsyon ve Besiyerleri	16
3.2. U-937 Hücresinin Temin Edilmesi ve Üretilmesi	17
3.3. Propolisin Hazırlanması	20
3.4. Deneyin Yapılışı	21
3.5. İstatistiksel Analiz	21
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	25
6. KAYNAKLAR	27

ÖZET

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 patogeneğinde 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.

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)-1 β , IL-6 ve tümör nekrozis faktör (TNF)- α düzeyleri ELISA ile ölçüldü.

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).

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

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

ABSTRACT

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.

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)-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α levels were measured in cell-free supernatants by ELISA.

IL-1 β , 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 ($p < 0.05$).

Propolis is a natural product to be examined for usage when needed the suppression of pro-inflammatory cytokines.

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

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM

Doğal ürünler, insanlar arasında binlerce yıldır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. 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 ürünüdür. Propolisin içeriği, mevsimsel koşullar, toplandığı coğrafya, arıların cinsi gibi koşullardan etkilense de, tüm arı kovanlarında aynı amaçlarla kullanılmaktadır. Buradan yola çıkılarak insanlar propolisi öncelikle, arıların kullanım amaçlarına benzer ihtiyaçlarla kullanmaya çalışmış, zamanla propolisin sahip olduğu zengin bileşik içeriğinin spesifik etkilerinin araştırılmasına yönelmişlerdir. Günümüzde propolisin antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antitümöral, antiinflamatuvar ve immünmodülatör gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu bilimsel çalışmalarla gösterilmiştir (1,2).

İmmün sistem, vücuda saldıran yabancı maddeleri tanıyabilen ve yıkıma uğratan bir koruma mekanizması olup, bugün birçok hastalığın tedavisinde immün sistemin baskılanması ya da aktive edilmesi yoluyla modüle edilmesi gerekmektedir. İmmün sistemin düzenlenmesinin; son yıllarda stres, ultraviyole ışınlar maruziyet, uykusuzluk, organ nakilleri ve kanser vakalarındaki artış gibi faktörlere bağlı olarak artan önemi ve kimyasal ilaçların olumsuz özelliklerinin belirgin bir biçimde ortaya çıkması, bu konuda doğal kaynaklara yönelimin hızlanmasına neden olmuştur. Son yıllarda propolis, immün sistem üzerine etkileri araştırılmaya başlanan önemli bir kaynaktır (1).

Makrofajlar, konak savunma mekanizmalarını içeren doğal ve kazanılmış bağışık yanıtta önemli role sahip hücrelerdir. Fagositoz, enzim ve sitokin 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-inflamatuvar 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-inflamatuvar sitokinlerin üretimi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Propolis Hakkında Genel Bilgiler

Propolis, arılar tarafından çeşitli bitkilerden toplanan ve arıların enzimleriyle işlenen reçinemsî bir kovan ürünüdür. Rengi yeşil, kırmızı ve koyu kahverengi tonlarında değişebilir. Karakteristik bir kokusu vardır ve derideki protein ve yağlarla etkileştiğinden yapışkan özellik gösterir. Genel olarak doğal propolis % 30 balmumu, % 50 reçine ve bitkisel balsam, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 protein ve diğer bazı bileşikler içerir (4).

Propolis toplama işlemi işçi bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından gerçekleştirilmektedir (Resim 2.1). Propolis seferine çıkan arı, önce mandibulaları ile propolisi bitkiden çekerek koparır. Ağzında nemlendirip yumuşatarak ve bazı enzimler ekleyerek pellet haline getirir ve pelleti ön bacaklarını kullanarak arka bacaklarındaki polen sepetine aktarır. Propolis yüklü olarak kovana gelen işçi arı ayaklarını kullanarak sıkıca peteğe tutunurken; kovadaki diğer işçi arılar mandibulalarıyla asılarak propolisi taşıyıcı arının polen sepetinden alırlar. Propolisi kovanda dip tahtası, çerçeve kenarları ve giriş deliği arkasında biriktirerek kullanırlar (4).

Arılar propolisi peteklerdeki ince kısımlara ya da yaşadıkları yerdeki oyuklara eklemektedirler. Propolisi delik ve yırtıkları kapatmak, petekleri onarmak, peteklerin zayıf kısımlarını kalınlaştırmak, kovana hava deliği yapmak ya da kovan defansına yardımcı olmak amacıyla kullanılırlar. Kovanda propolisi, balmumuna karıştırarak larva yuvalarının cilalanması ve steril edilmesi amacıyla da kullanırlar. Ayrıca yavru yetiştirme döneminde yarık ve çatlaklardan suyun buharlaşıp kaybolması engellenmekte, böylece kovan içi gerekli olan nem korunmuş olmaktadır (5). Propolisi, kovan içinde öldürdükleri ancak kovan dışına taşıyamadıkları organizmaların mumyalanmasında da kullanırlar. Arılar propolisin hem mekanik hem biyolojik aktivitesinden faydalanır. Propolis mumyalanmış işgalcilerin bozulmasını engeller ve buna bağlı olarak atmosfere oranla mumyalarda daha az bakteri ürer (6). Propolisin mikroorganizmalar üzerine olan bu özel etkisinden ötürü insanlar tarafından antik çağlardan beri farmasötikal içerik olarak kullanılmıştır.



Resim 2.1. Bal arısı *Apis mellifera*

2.2. Propolisin Fiziksel Özellikleri

Propolis 10°C altında sert ve kırılğan olup, derin dondurucuya konduğu zaman hemen katılaşır. İstenirse bir öğütücü yardımıyla toz haline getirilebilir. Propolis, 15-25°C arasında mum kıvamında elastik bir yapı göstermektedir; 30-40°C arasında ise yumuşayıp yapışkan bir durum almakta ve bu durum yaz aylarında arıcının çalışmasını güçleştirmektedir. 80°C'de kısmen erir. Kovandan alındığı zaman yapışkan ve kendine özgü bir kokusu olan propolisin rengi; bitki türüne, kaynağına, yaşına bağlı olarak sarıdan koyu kahverengiye kadar değişmektedir. Propolisin rengi, kokusu ve tıbbi karakteri bitkiye, bölgeye, mevsime ve koloniye bağlı olarak değişir. Şeffaf propolisin varlığı da kaydedilmiştir (Resim 2.2) (7).



Resim 2.2. Kovan içinden propolis örneği

2.3. Propolisin Kimyasal İçeriği

Propolis, farklı kimyasal özellikte bileşikler ve mineral maddeler içeren, oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir. Kimyasal bileşimi; topladığı bitkiye, bölgeye, mevsime ve koloniye bağlı olarak değişir. Bununla birlikte, ortalama % 50 reçine, % 30 mum, % 10 esansiyel ve aromatik yağlar, % 5 polen, % 5 diğer maddeler ve organik kalıntılardan ibarettir (8).

Propolis suda ve hidrokarbon çözücülerde az, alkollerde ise oldukça fazla çözünürlük göstermektedir. Etanol dışında eter, glikol, metanol, yağ gibi çözücülerde de çözünebilmektedir. Etanol dışında çözücüler kullanıldığında propolisden izole edilecek maddelerin farklılaştığı ve birçok bileşenin izole edilemeyeceği görülmüştür. Bundan dolayı propolis için en çok kullanılan çözücü % 96'lık etanoldür (9).

Propolis ekstraksiyon metodları propolisin etkisini değiştirebilir. Çünkü değişik çözücülerdeki çözünürlüğü ve ekstre olmuş kısımları çözücüye göre farklılık gösterecektir. Biyolojik çalışmalarda en çok kullanılan çözücülerdeki etanol ve farklı konsantrasyonlardaki su ve metanol karışımlarıdır. Propolisin kimyasal içeriği çok komplekstir, şimdiye kadar 300'den fazla kimyasal madde teşhis edilmiştir ve propolisin alındığı bitki ve floraya bağlı olarak bu içerik farklılık göstermektedir. Propolis içeriğindeki bu değişimden dolayı medikal kullanımda ve standardizasyonunda problemler yaşanmaktadır (10).

Araştırmalar flavonoidlerin, tropikal bölgedeki ve Avrupa'daki propolis örneklerinde, bitkisel kaynakları farklı olmasına rağmen ortak propolis bileşenleri olduğunu ortaya koymuştur (11). Tropikal bölgelerden elde edilen propolisde bitkisel kaynağı halen aydınlatılamamış bir seri lignan analiz edilmiştir. Kanarya adalarından toplanan propolisde ise 13 çeşit furofuran çeşidi lignan bulunmuştur ve bunların çoğu halen tam olarak analiz edilememiştir (12). Brezilya ve Mısır'dan toplanmış propolisde bazı triterpenik alkollere rastlanmıştır (13). Ayrıca uçucu bileşikler, şekerler, hidrokarbonlar, minerallere de çeşitli propolis örneklerinde rastlanmıştır (14).

2.4. Propolisin İnsanlar Tarafından Kullanılması

Propolis yeni bir keşif değildir. Propolis kullanımı milattan öncelere (MÖ 300) dayanmaktadır. O zamanlarda dünyanın birçok yerinde dahilen ve haricen ilaç olarak kullanılmıştır. Propolis Mısırlılar tarafından ölülerin mumyalanmasında kullanılmıştır (15).

Mısırlılar, Yunanlılar ve Romalılar, propolisin genel iyileşme sürecine olumlu katkısını ve deri lezyonları tedavisi hakkında faydalarını rapor etmişlerdir. Propolis her zaman anti-inflamatuar ajan olarak kabul edilmiş ve yara ve ülserlerin tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde propolis ilaçlarda, kişisel ürünlerde ve birçok preperatta kullanılmaktadır (Resim 2.3). Bilim adamları ancak son yıllarda içeriğine ve biyolojik etkilerine yönelik çalışmalar yapmaya başlamıştır (16).



Resim 2.3. Propolisin preperat örnekleri

Propolis kremlerinin, iyileşme süresini kısalttığı ve acı hissini azalttığı rapor edilmiştir. Bunların yanında propolisin genel olarak merhemlere antibakteriyel etkilerini arttırmak amacıyla katıldığı bilinmektedir. Propolisin diş çürüklerinde, diş ağrılarında ve diş iltihablarında da kullanıldığına dair pek çok çalışma mevcuttur. Propolisin ağız yıkama preperatlarının içine katılarak veya diş macunu olarak kullanılarak, ağız iltihablarının ve diş hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı kaydedilmektedir. Propolis ayrıca diş aralarını temizlemeye yarayan mumlu ipliklerin yapımında da kullanılmaktadır (17, 18).

Uçuk ve gribe neden olan virüslere karşı başta kafeik asit olmak üzere propolisin içerdiği bazı bileşiklerin etkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (19). Süt ile propolis preperatı alan astım hastalarında önemli ölçüde iyileşme görülmüş ve astım nöbetlerinde hafifleme gözlenmiştir (17, 18).

Günümüzde propolis ekstresinin kan basıncını düşürdüğü, sakinleştirici etki yarattığı ve serum glikoz oluşumuna olumlu etkiler sağladığı bildirilmiştir. Propolisde bulunan

dihidroflavanoidlerin kılcal damarları kuvvetlendirdiği ve antihiperlipidemik aktivite oluşturduğu da belirlenmiştir (20).

Propolisin bağışıklık sistemi hücrelerini aktive ettiği de bilinmektedir. Propolis, başta cilt kanseri olmak üzere çeşitli kanser tedavisinde de denenmektedir (17).

2.5. Propolisin İmmün Sistem Üzerine Etkileri

2.5.1. Propolisin Makrofajlar Üzerine Etkileri

1990'lara kadar immünmodülör sistem hakkında çok az şey bilinirken, son 10 yılda bu araştırma sahasında birçok çalışma yapılmış ve birçok yeni bilgilere ulaşılmıştır. Son yıllarda propolis, immün sistem üzerine etkileri araştırılmaya başlanan önemli bir doğal kaynaktır (21).

Yapılan çalışmalarda propolisin, kompleman sistemini doğrudan ya da makrofajlardan sitokin salınımı yoluyla etkilediği rapor edilmiştir. İn vitro deneylerde propolisin sulu ekstraktının (63-1000 µg/ml) kompleman sisteminin klasik ve alternatif yollarını inhibe ettiği gösterilmiş, propolisin içeriğindeki flavonoidler ve fenolik bileşiklerin en önemli anti-kompleman (anti-C3) etkili bileşikler olduğu bildirilmiştir (22).

Propolis etken maddelerinden özellikle kaffeoligunic asitin, makrofajların hareket ve yayılımını arttırdığı tespit edilmiştir. Böylece makrofajların etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir (23).

Propolisin makrofaj aktivasyonuna etkilerinin incelendiği in vitro çalışmalarda, bu hücrelerde H₂O₂ oluşumunun arttığı, böylece fagosite edilen mikroorganizmaların öldürülmesi yönünde pozitif etkilerinin olduğu bildirilmektedir (24). Bu amaçla yapılan bir çalışmada propolis, in vitro ortamda 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda makrofaj hücrelerine uygulanmış ve H₂O₂ salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Propolisin sinnamik asit bileşiminin, peritoneal makrofajlarda H₂O₂ üretimini inhibe ettiği, kafeik asit bileşiminin ise bu üretimi indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca flavonların, protein kinaz C fosforilasyonu mekanizmasıyla luminole bağlı kemoluminesken mürin makrofajları inhibe ettiği gösterilmiştir. Tavşan nötrofilleri üzerinde yapılan bir çalışmada propolisin ve bazı bileşimlerinin, bu hücrelerde süperoksid anyonu üretimi üzerine inhibitör etki gösterdiği belirtilmiştir. Ancak propolisin, makrofajlar tarafından serbest radikallerin üretimi konusundaki etkileri hala netleşmemiştir (25).

Makrofaj aktivasyonunun bir belirteci de L-arginin tarafından nitrik oksidin (NO) sentezlenmesidir. Nitrik oksit, DNA sentezini engeller, enerji üretimini baskılar, bakteri ve mantar membranlarında aktif transportu engelleyerek mikrobisidal etki gösterir. Ayrıca NO önemli bir nörotransmittter, vazodilatatör ve hücre yenileyici medyatördür (26). Orsi ve arkadaşları, propolis ile tedavi edilen farelerde IFN- γ ile uyarılan peritoneal makrofajlardan H₂O₂ ve NO üretiminin arttığını göstermişlerdir (24). Yapılan farklı çalışmalarda ise, propolis maruziyeti altındaki makrofajlarda NO üretiminin baskılandığı gösterilmiştir (27, 28). NO, makrofajların mikrobisidal mekanizmalarında önemli role sahip bir moleküldür. Ancak devam eden salınımı konakta doku hasarına neden olacağından propolisin NO üzerindeki inhibitör rolü önemli olabilir. Ansorge ve arkadaşları, propolis ile inkübasyondan sonra periferel monositler ve T hücre süpernatantlarında TGF- β 1 konsantrasyonunun arttığını bildirmişlerdir. TGF- β 1, NOS₂ (nitrik oksit sentaz) ekspresyonunun güçlü bir baskılayıcısı olduğundan, propolisin NO üretimindeki inhibisyonunu bu şekilde açıklamışlardır (29). Bir diğer çalışmada propolisin, nitrik oksit sentaz geni ekspresyonunu inhibe ederek NO üretimini baskıladığı açıklanmıştır (30).

Moriyasu ve arkadaşları, propolisin lipopolisakkarit ile uyarılan makrofajlardan NO üretimini inhibe ettiğini, Krol ve arkadaşları bu etkinin flavonoidlere bağlı olduğunu göstermişlerdir. Hu ve arkadaşları da, propolisin su ve etanoldeki çözeltisinin mürin modelli akut inflamasyonda NO üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (1).

Propolisin BALB/c farelerde makrofajlar üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, farelere 200 mg/kg propolis uygulanmış ve bu farelerin peritoneal makrofajlarından kontrole göre daha çok H₂O₂ üretildiği ve NO üretiminin inhibe olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada farelerin timus, kemik iliği, dalak ve adrenal bezleri histopatolojik olarak incelenmiş, stres altındaki farelerin timusunda, kemik iliğinde ve adrenal bezlerinde bir değişiklik görülmezken, dalaktaki germinal merkezlerde büyüme olduğu tespit edilmiş ancak propolis uygulanan farelerde dalaktaki bu değişimin olmadığı bildirilmiştir (1).

Yapılan bazı çalışmalarda, propolisin bitkisel kaynaklarını ve propolisin biyolojik aktivitelerini göz önünde bulundurarak tedavi amaçlı doğrudan kullanmanın hata olacağı vurgulanmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, propolisin 3 ana kaynağı (*Araucaria*, *Baccharis*, *Eucalyptus*) ele alınmış, bu bitkilerin H₂O₂ ve NO metabolizmasına bir etki göstermediği ortaya konmuştur. Bu çalışmada propolisin etkisinin toplandığı bitkilere göre

değiştirdiği ancak bu bitkilerden izole edilen bileşiklerin tek başına propolisle aynı etkiyi göstermediği kanıtlanmıştır (31).

Propolisin, makrofajların mikrobisidal aktivitesi üzerine olan etkisini artırmak için yapılan çalışmalar da vardır. Bu konuda Bulgaristan ve Brezilya propolisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, makrofojların propolis varlığında dimorfik bir mantar olan *Paracoccidioides brasiliensis* üzerindeki fungusit etkisi incelenmiştir. Bu mantar, Latin Amerika'da en çok görülen sistemik mikoz etkeni olup, konakçının savunmasında hücresel bağışıklığın büyük rolü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle planlanan bu çalışmada, *P. brasiliensis* ile enfeksiyon oluşturulan farelere propolis verildiğinde her iki propolis örneğinin de makrofajların fungisidal aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (32, 33).

Orsi ve arkadaşları ise makrofajlar içinde yaşama ve çoğalma yeteneğinde olan *Salmonella typhimurium* bakterisine karşı propolisin, makrofajların, oksijen ve nitrojen ara ürünlerin oluşumuna bağlı olarak bakterisidal aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir (34). Brezilya ve Bulgaristan propolisinin de makrofajların *S. typhimurium*'a karşı göstermiş olduğu bakterisidal aktiviteyi konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı (3, 10 , 30 ve 100 µg/100µl) gösterilmiş ve propolis örneklerinin farklı coğrafyalardan alınmış olmasına rağmen etkilerinde bir farklılık gözlenmediği bildirilmiştir (1).

Araştırmacılar %10'luk propolisin 3 gün boyunca uygulanması sonucu, mürin lenfomasına karşı doğal öldürücü hücrelerin sitotoksik aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Bunun sonucunda propolisin kısa süreli uygulanmasının immün sistemi olumlu etkileyeceğini kaydetmişlerdir. Doğal öldürücü hücreler, IFN- α , IFN- β , TNF- α , TGF- β 1, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-21, IL-23 gibi sitokinlerin etkisi altındadır. Ancak propolisin bu mekanizmayı nasıl aktive ettiği hala sırrını korumaktadır (1).

2.5.2. Propolisin Lenfositlere ve Antikor Üretimine Etkileri

Propolisin concanavalin A (Con A) tarafından indüklenen lenfositlerin poliklonal aktivasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmada, propolisin Con A varlığında ve yokluğunda splenosit proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir. Aynı hücrelerin kültür süpernatantlarında IFN- γ üretiminin ise arttığı gözlenmiş ve bu sonuçların, propolisin spesifik ve nonspesifik immün yanıt üzerine immünmodülatör etkilerinin anlaşılmasında önemli olduğu rapor edilmiştir (35).

Propolisin immün sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, periferel mononükleer kan hücrelerinde ve T hücrelerinde fitohemaglutinin ile indüklenmiş DNA sentezini doza bağlı olarak baskıladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda makrofajlardan IL-1beta, IL-12, Th-1 hücrelerinden IL-2 ve Th-2 hücrelerinden IL-4 üretimini baskıladığı, ancak T regülatuar hücrelerden TGF-beta1 üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Bu etkilerden propolisin, kafeik asit fenil ester, quersetin flavonoidi ve herperidin gibi bileşenlerinin sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlarla araştırmacılar, propolisin immün sistem hücrelerinin temel fonksiyonları üzerinde düzenleyici rolü olduğunu ve güçlü bir doğal anti-inflamatuar ilaç olarak kabul edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (29).

Dantas ve arkadaşları, Bulgar propolisinin etanolik ekstraktını (25-100 mg/kg) *T. cruzi* ile infekte edilmiş Swiss farelerine oral yoldan uygulamışlar, parazitemide azalma gözlerken hepatik ya da renal toksik etkiye rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Aynı zamanda bu farelerin periferik kanında, CD8(+) düzeyinde artma, CD4(+)CD69(+), CD8(+)CD69(+), CD4(+)CD44(+) ve CD8(+)CD44(+) düzeylerindeki enfeksiyona bağlı oluşan artışta baskılanma olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle propolisin T hücre regülasyonu ile immün yanıtta etki ettiği vurgulanmıştır (36).

Propolisin adjuvan kapasitesini incelemek amacıyla, farelerde inaktif Suid herpesvirüs tip-1 (SuHV-1) aşısına ilave edilerek kullanılmıştır. Çalışmada farelere SuHV-1 aşısı, adjuvan olarak alüminyum hidroksit ve propolis ekstraktı (5mg/doz) eklenerek uygulanmış, propolisin eklendiği aşının, propolisin veya aşının tek başına verilmesine göre daha yüksek antikor cevabına sebep olduğu bildirilmiştir (37).

Propolisin adjuvan kullanımı, inaktive edilmiş *Aeromonas hydrophila* aşısının sazan balıkları üzerinde denendiği bir çalışmada da değerlendirilmiştir. Propolisin adjuvan olarak kullanıldığı aşının uygulandığı balıklarda, *A. hydrophila*'ya karşı fagositik aktivitenin ve serum antikorlarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (1).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN TAMPON, SOLÜSYON VE BESİYERLERİ

3.1.1. Phosphate Buffer Saline (PBS) tamponu

Aşağıdaki formüle göre PBS hazırlandı:

K ₂ HPO ₄	1,20 g
Na ₂ HPO ₄	0,22 g
NaCl.....	8,5 g
Distile su.....	1000 ml

Hazırlanan PBS'nin pH'ı, pH metre cihazı (WTW 340, Almanya) ile pH 7,0' ye ayarlandı. Daha sonra otoklavda (Hiroyama, Japonya) steril edildi.

3.1.2. Fetal Bovine Serum (FBS)

İnaktive edilmiş fetal bovine serum (Biological, İsrail) ticari olarak satın alındı. Biyolojik güvenlik kabininde (Nüve, Türkiye) 10 ml'lik steril falcon tüplere alıquotlanarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1.3. Penisilin Streptomisin Solüsyonu

Penisilin (10000 U/ml) – streptomisin (10 mg/ml) solüsyonu (Gibco, Almanya) ticari olarak satın alındı. Biyolojik güvenlik kabininde 2ml'lik steril eppendorf tüplere alıquotlanarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

3.1.4. Hücre Dondurma Solüsyonu

FBS.....	9 ml
DMSO.....	1 ml

Steril falcon tüpte karıştırıldı, 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi.

3.1.5. Hücre Yıkama Solüsyonu

PBS.....10 ml

Penisilin- streptomisin300 µl

Steril falcon tüpte karıştırıldı, 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi.

3.1.6. RPMI-1640 Besiyeri

Hücre mediumu olarak kullanılacak RPMI-1640 besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlandı:

RPMI- 1640 (25mM HEPES ve L- Glutamin içeren).....88 ml

İnaktif FBS10 ml

Penisilin- streptomisin2 ml

Ticari olarak satın alınan RPMI- 1640 (Sigma, USA) besiyeri üzerine % 10 oranında inaktive edilmiş steril FBS ve % 2 oranında penisilin- streptomisin solüsyonu ilave edildi. Hazırlanan besiyeri miktarı 1 haftalık ihtiyaca göre ayarlandı ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı.

3.2. U-937 HÜCRESİNİN TEMİN EDİLMESİ VE ÜRETİLMESİ

LGC Promochem'den elde edilen ATCC U-937 insan makrofaj hücresi ile çalışıldı.

3.2.1. Hücrelerin Çözdürülmesi

- Çözdürülecek hücreler için taze besiyeri (%10 FBS, %2 penisilin-streptomisin ilaveli RPMI-1640) oda sıcaklığında hazır bulunduruldu.
- Su banyosu (Nüve, Türkiye) 37 °C'ye ayarlandı.
- Hücre -80°C soğutucudan (Operon, Kore) çıkarıldı, sıcaklığı 37 °C'ye ayarlı su banyosunda hızla çözdürüldü
- Çözdürülen hücre çözeltisinden 1 ml, 9 ml taze besiyeri içine eklenip pipetaj yapıldı. 1500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant çekilip uzaklaştırıldı.
- Pellet üzerine 4 ml kadar taze besiyeri eklenip süspansiyon haline gelene kadar pipetaj yapıldı.
- Bu süspansiyondan 1'er ml, 9'ar ml taze besiyeri içeren hücre kültür flasklarına eklendi. Flasklar % 5 CO₂'li inkübatöre (Sanyo, Japonya) 37°C ye kaldırıldı.

3.2.2. Hücrelerin Pasajlanması

- Hücreler düzenli olarak invert mikroskopta (Leica, Almanya) hücrenin morfolojisi ve sayısı yönünden incelendi.
- Hücrelerin durumuna göre ortalama 2 günlük aralıklarla pasajı yapıldı.
- %5 CO₂'li inkübatörden çıkarılan hücre kültür flaskları biyolojik güvenlik kabinine alındı.
- Hücre kültür flasklarındaki medium pastör pipeti ile pipetaj yapılarak konik tabanlı santrifüj tüplerine aktarıldı.
- 1500 devirde 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp pellet hücre yıkama çözeltisi ile yıkandı. Tekrar santrifüj edildi.
- Pellet oda sıcaklığına getirilen, 4ml hücre mediumu ile süspanse edildi.
- Bu süspansiyondan 1'er ml; 9'ar ml taze besiyeri içeren hücre kültür flasklarına eklendi.
- İntert mikroskop ile hücreler kontrol edildi.
- Hücre kültür flaskları üzerine pasaj sayısı ve tarih yazılarak, 37°C'de %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

3.2.3. Hücrelerin Canlılık Kontrolü

- Her pasaj işleminde hücrelerin canlılığı trypan blue (Biological, İsrail) ile kontrol edildi.
- Lam üzerine 10µl hücre süspansiyonu ve 10µl trypan blue boyası koyularak karıştırıldı.
- Işık mikroskopunda (Leica, Almanya) x 40 büyütmede 100 hücre sayıldı.
- Boya almayan hücrelerin (canlı hücreler) yüzde oranı hesaplandı.

3.2.4. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler pasajlanırken, 4.-10. pasaj sayısı aralığında bazı hücrelerin pasajı devam ettirilirken, bir kısım hücre ileri çalışmalarda tekrar kullanılabilmesi amacıyla dondurularak saklandı.

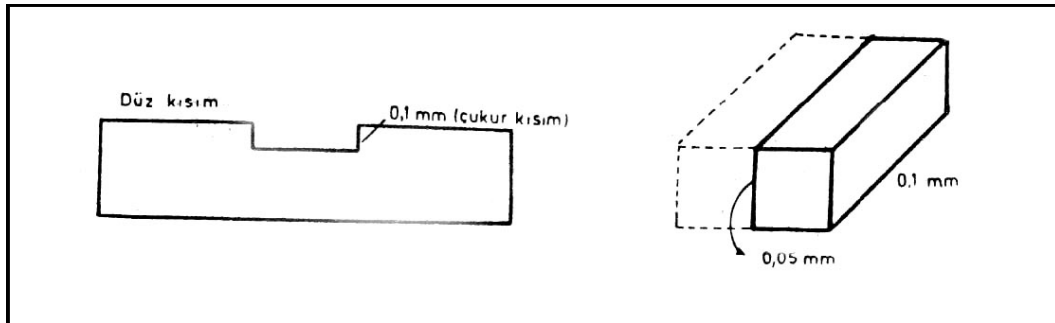
- Hücre kültür flasklarındaki medium pastör pipeti ile pipetaj yapılarak konik tabanlı santrifüj tüplerine aktarıldı.
- 1500 devirde 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp pellet hücre yıkama çözeltisi ile yıkandı. Tekrar santrifüj edildi.
- Pellet, dondurma çözeltisinde süspansiyon edilerek son hacim yaklaşık $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı.
- Eş zamanlı olarak trypan blue ile canlılık kontrolü yapıldı.
- Bu karışımdan 2'şer ml, -80°C 'ye dayanıklı krio tüplerine aktarıldı.
- Krio tüpleri üzerine tarih, pasaj sayısı ve canlılık oranı not edildi.
- Dakikada 1°C soğutan izopropil alkollü özel kontainer içinde -80°C soğutucuya kaldırıldı.

3.2.5. Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımında thoma lamı kullanıldı.

Thoma Lamı ile Hücre Sayımı

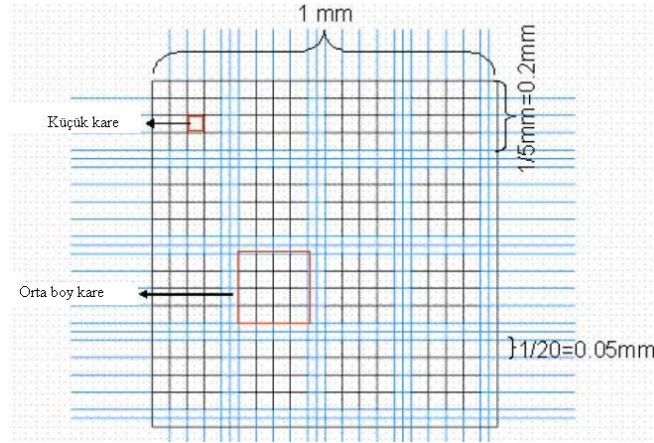
Thoma lamının esası, $0,1 \text{ mm}^3$ hacimde sayım yapılmasıdır. Thoma lamının yandan görünüşü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Thoma lamı yandan görünüş

Şekilde görüldüğü gibi lamın çukur bir kısmı vardır. Kültür, bu kısım üzerine aktarılır, lamel kapatıldığında bu çukurda $0,1 \text{ mm}$ yüksekliğinde bir sıvı kalır. Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir (Şekil 3.2). Lamel konduktan sonra üzerine bastırılarak lamın çukuru dışında kalan düz kısım ile lamel arasında bir sıvı katmanının kalması önlenir. Böylece çukur alan içinde tam olarak $0,1 \text{ mm}$ yüksekliğinde sıvı bulunması sağlanmış olur. Thoma lamında 1 büyük kare 16 orta boy kare, her orta boy karede 25 küçük kare olmak üzere

toplam 400 küçük kare vardır. Sayım bu karelerde yapılır. Şekil 3.2’de bir küçük kare gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, küçük kare olarak belirtilen gerçekte bir kare prizmadır. Derinlik boyutu, şekilde verilen çukurun derinliğini göstermekte olup, $1/10 = 0,1$ mm dir. 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = $0,05$ mm x $0,05$ mm x $0,1$ mm = $0,00025$ mm³ = $1/4.000$ mm³’dür. Bir sayım alanında $16 \times 25 = 400$ küçük kare olduğundan toplam sayım hacmi = $0,00025$ mm³ x $400 = 0,1$ mm³’dür.



Şekil 3.2. Thoma lamı üstten görünüş

Thoma lamında sayım sonucu **A x SF x 16 x 10.000** formülü ile hesaplanır.

A : Bir orta boy karede sayılan hücre adedi

SF : Seyreltme faktörü

16 : 16 adet orta boy kare olduğundan tüm kare sonucuna erişmek için kullanılan çarpan

10.000 : $0,1$ mm³’deki sayım sonucunu 1 ml’deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez

3.3. PROPOLİSİN HAZIRLANMASI

Çalışmada, Kayseri ve çevresinden toplanan propolis’in etanol ile hazırlanan ekstresi kullanıldı. Steril membran filtreden süzülerek steril hale getirilen stok ekstre solüsyonundan $16-512$ µg/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 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlanan makrofaj hücreleri üzerine ayrı ayrı eklendi. Plaklar 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Her bir kuyucuktaki hücreler, inkübasyon sonunda trypan blue ile boyanarak ışık mikroskopunda canlılık oranı yönünden incelendi. Hücrelerin % 80-90 oranında canlı kaldığı propolis konsantrasyonu (64 $\mu\text{g/ml}$) deney için kullanıldı.

3.4. DENEYİN YAPILIŞI

Hücrelerin canlılığı trypan blue ile boyanarak ışık mikroskopunda kontrol edildi. % 90 oranında canlı oldukları tespit edilen hücrelerin yoğunluğu hemositometrede sayılarak kuyucuklarda son konsantrasyonu 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ayarlandı ve 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarının çalışma kuyucuklarına total hacim 1800 μl 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 CO_2 'li ortamda inkübe edildikten sonra PMA içeren medium çekilerek taze medium eklendi. İlgili kuyucuklara LPS (*Escherichia coli*, serotip O26:B6) (Sigma, USA) 10 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda uygulandı (38).

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)

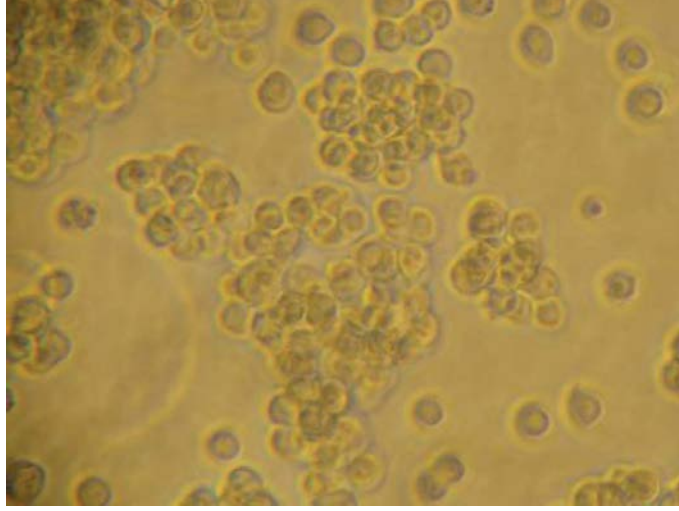
Her bir grup üçer kuyucuktan oluştu. Hücre kültür plakları 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Hücre kültür süpernatantlarında sitokin (IL-1 β , IL-6, TNF- α) düzeyleri, ELISA kitleri (İnvitrogen, USA) ve ELISA cihazı (Biotek, Synergy HT, USA) kullanılarak ölçüldü. Her bir grup üç kez çalışıldı. Grafikler, grupların ortalama + standart sapma değerlerine göre elde edildi.

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

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.

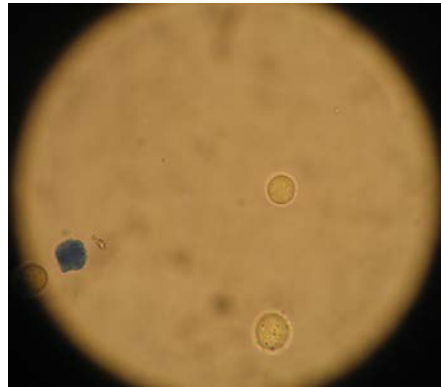
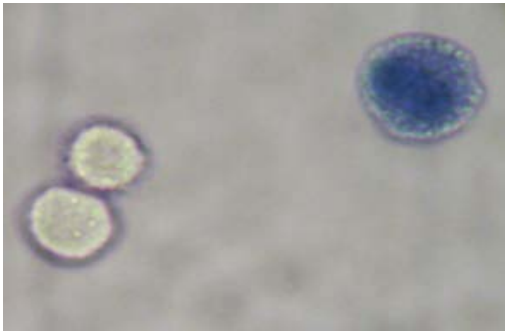
4. BULGULAR

Kontrol grubu makrofaj hücrelerinin invert mikroskopta görünümü Şekil 4.1’de verilmiştir.



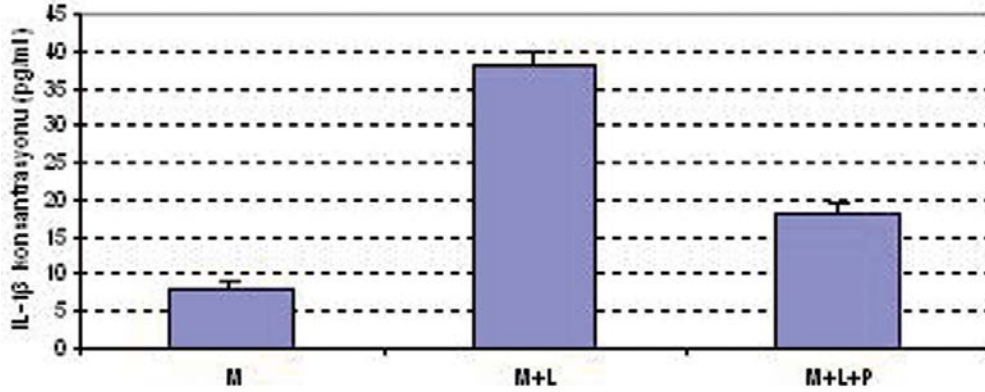
Şekil 4.1. Kontrol grubu makrofaj hücrelerinin invert mikroskopta görünümü (x 400 büyütme)

Makrofaj hücrelerinin trypan blue ile boyanarak canlılık tayininde ışık mikroskopik görüntüleri Şekil 4.2’de sunulmuştur. Boya almayan hücreler canlı, mavi boyanan hücreler ölü olarak değerlendirilmiştir.

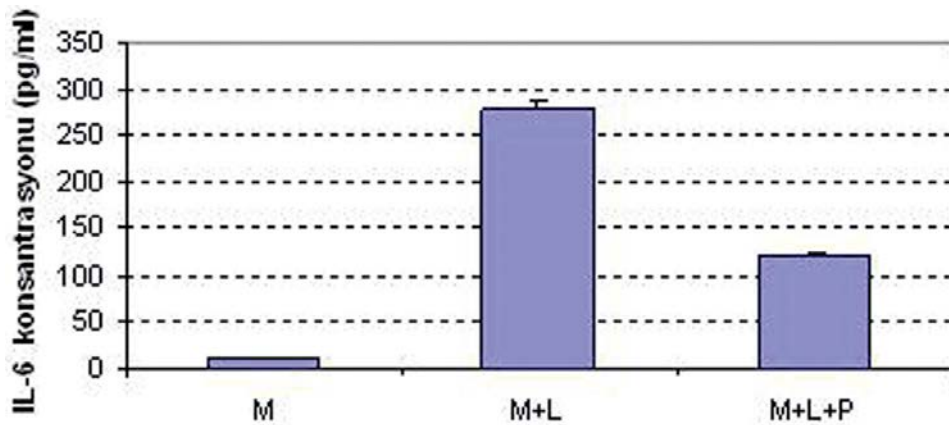


Şekil 4.2. Trypan blue ile boyanan hücrelerin ışık mikroskopik görüntüleri

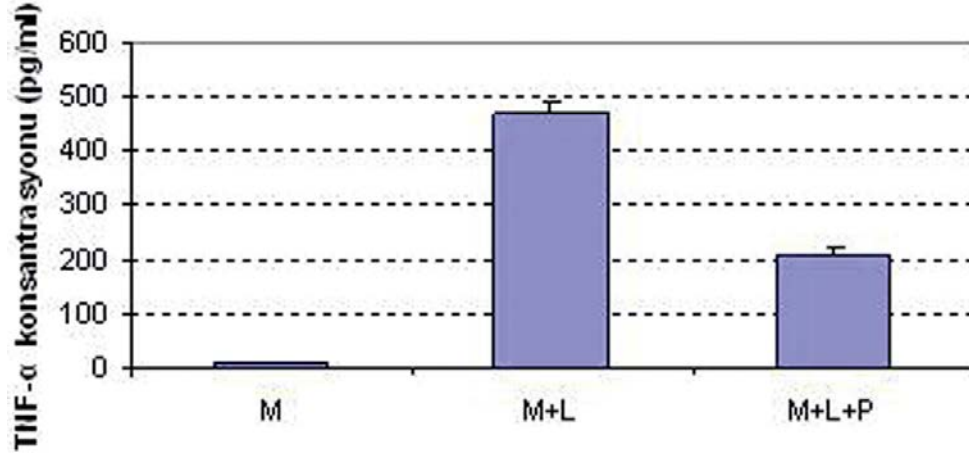
LPS uygulanan hücre grubunda, IL-1 β , IL-6 ve TNF- α düzeylerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanırken, LPS ve propolis uygulanan hücre grubunda - yalnız LPS uygulanan hücre grubuna göre- her üç sitokin düzeyinde de anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (p < 0.05) (Şekil 4.3 - 4.5).



Şekil 4.3. 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 4.4. 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 4.5. 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)

5. TARTIŞMA

Makrofajlar, hem fagositoz özelliği ile hem de çeşitli sitokinleri üreterek konak savunmasına yardımcı olur. Ancak makrofajların aşırı aktivasyonu inflamatuvar sitokinlerin fazla üretimi yoluyla hücrelerde hasara ve inflamatuvar 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 propolisin, toksik etkisinin olmaması, kolay elde edilebilir olması ve geniş biyolojik aktiviteye sahip olması gibi nedenlerden dolayı tedavi amacıyla kullanımı gittikçe önem kazanmaktadır. Propolis, anti-inflamatuvar, 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 (39).

Propolisin, makrofajlar içinde yaşama ve çoğalma yeteneğinde olan *Salmonella typhimurium* bakterisine karşı, makrofajlarda, oksijen ve nitrojen ara ürünlerin oluşumunu sağlayarak bakterisidal aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (34). Brezilya ve Bulgaristan propolisinin de makrofajların *S. typhimurium*'a karşı göstermiş olduğu bakterisidal aktiviteyi konsantrasyona bağlı olarak arttırdığı (3, 10 , 30 ve 100 µg/ 100µl) gösterilmiştir (1). Propolisin immün sistem üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, periferel mononükleer kan hücrelerinde ve T hücrelerinde fitohemaglutinin ile indüklenmiş DNA sentezini doza bağlı olarak baskıladığı gösterilmiştir. Aynı zamanda makrofajlardan IL-1β, IL-12, Th-1 hücrelerinden IL-2 ve Th-2 hücrelerinden IL-4 üretimini baskıladığı, ancak T regülatuar hücrelerden TGF-β1 üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Bu etkilerden propolisin, kafeik asit fenil ester, quersetin flavonoidi ve herperidin gibi bileşenlerinin sorumlu olduğu ortaya konmuştur. Bu sonuçlarla araştırmacılar, propolisin immün sistem hücrelerinin temel fonksiyonları üzerinde düzenleyici rolü olduğunu ve güçlü bir doğal anti-inflamatuvar ilaç olarak kabul edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (29).

Propolis'in etanolik ekstraktının fare kulak inflamasyon modelinde ve rat artrit modelinde anti-inflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (39, 40). Ayrıca in vitro olarak mürin peritoneal makrofajlardan prostaglandin ve lökotrien oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (41). Blonska ve arkadaşları çalışmalarında, Propolis'in etanolik ekstraktının ve onun bazı aktif

bileşenlerinin in vitro olarak LPS ile uyarılmış makrofajlardan IL-1 β ve indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu baskıladığını bildirmişlerdir (39).

LPS, Gram negatif bakterilerin dış membran komponenti olup, makrofajlardan IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını indükler ve septik şok patogenezinde önemli rol oynar (42, 43). Korish ve Arafa, bir propolis bileşeni olan kafeik asit fenetil esterini, 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 inflamatuvar sitokinlerde azalma ve anti-inflamatuvar sitokin düzeyinde artışa yol açtığını, karaciğer ve beyin hücrelerini LPS'nin toksik etkilerinden koruduğunu göstermişlerdir (42).

İn vitro olarak, U937 makrofajlarında LPS maruziyetinin proinflamatuvar sitokin sekresyonunu arttırdığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir (43, 44). Bu çalışmada 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-inflamatuvar sitokinlerin baskılanması gerektiği durumlarda kullanılabilir bir ajan olarak, özellikle içerisinde bulunabilecek farmakolojik aktif bileşenleri üzerinden incelenmesi gereken doğal bir üründür.

6. 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. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 1995; 26: 83-99.
5. Gençay Ö, Sorkun K. Propolis hakkında neler biliyoruz? *Teknik arıcılık* 2002; 75: 17-21
6. Ghisalberti E. Propolis: a review. *Bee Wld* 1978; 60: 59–84.
7. Woo KS, Park JS. Eucalyptus propolis beverages with their composition and effects. In Mizrahi A, Lensky Y(eds), *Bee Products Properties, Applications and Apitherapy*. New York, Plenum Pres, 1997: 125-128.
8. Sforcin JM, Fernandes JRA, Lopes CAM, Bankova V, Funari SRC. Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2000; 73: 243-249.
9. Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, Elmaliyah M, Mizrahi Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drug Exp Clin Res* 1997; 23: 89-96.
10. Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc* 2004; 15: 964–970.
11. Wollenweber E, Buchmann SL, Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplar (*Populus* spp.), *Z Naturforsch* 1997; 52: 530–535.
12. Bankova V, Christov R, Delgado Tejera A. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands, *Phytochemistry* 1998; 49: 1411–1415.
13. Marcucci MC, Rodriguez J, Ferreres F, et al. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo state, *Z Naturforsch* 1998; 53: 117–119.

14. Vassya S, Bankova, Solange L, De Castro, Maria C. Marcucci Propolis: recent advances in chemistry and plant origin *Apidologie* 2000; 31: 3–15.
15. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005; 2: 33–38.
16. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 114–117.
17. Khayal MT, El-Ghazaly MA, El Khatib ASD, et al. A clinical pharmacological study of the potential benefits of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fund Clin Pharmacol* 2003; 17: 93-102.
18. Albayrak S. *Leishmania tropica* üzerine Kayseri propolisinin antileishmanial aktivitesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Birimleri Enstitüsü, Kayseri 2009; ss 10-11.
19. Amoros M, Simoes CMO, Gire L, Sauvager F, Cormier M. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type 1 in cell culture. *J Nat Prod* 1992; 55: 1732-1740.
20. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Popov S, Kujumgiev A. Türkiye ve Bulgaristan Kökenli propolis örneklerinin kimyasal bileşimi ve biyolojik aktiviteleri. *Mellifera* 2001; 1(1): 24-26.
21. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol* 1998; 36: 347–363.
22. Georgieva P, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Anticomplement activity of lysine complexes of propolis phenolic constituents and their synthetic analogs. *Z Naturforsch* 1997; 52: 60–64.
23. Tatefuji T, Izumi N, OhtaT, et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 966–970.
24. Orsi RO, Funari SRC, Soares AMVC, et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins* 2000: 205-219.

25. Cuesta A, Rodríguez A, Esteban M.A, Meseguer J. In vivo effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol* 2005; 18: 71–80.
26. Chakraborty PD, Bhattacharyya D, Pal S, Ali N. In vitro induction of nitric oxide by mouse peritoneal macrophages treated with human placental extracts. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 100–107.
27. Moriyasu J, Arai S, Motoda R, Kurimoto M. *In vitro* activation of mouse macrophage by propolis extract powder. *Biotherapy* 1994; 8: 364-365.
28. Krol W, Czuba ZP, Pietsz G, Threadgill MD, Cunningham BDM. Modulation of the cytotoxic activity of murine macrophages by flavones. *Curr Topic Biophysics* 1996; 20: 88-93.
29. Ansorge S, Reinhold D, Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells. *Z Naturforsch* 2003; 58: 580-589.
30. Song YS, Park EH, Hur GM, et al. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *J Ethnopharmacol* 2002; 80: 155-161.
31. Lopes FC, Bankova V, Sforcin JM. Effect of three vegetal sources of propolis on macrophages activation. *Phytomedicine* 2003; 10: 343.
32. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Trends Microbiol* 2002; 10: 80–87.
33. Murad JM, Calvi SA, Soares AMVC, Bankova V, Sforcin JM. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002; 79: 331–334.
34. Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 359-368.
35. S´a-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *J Ethnopharmacol* 2003; 87, 93–97.

36. Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FHM, De Castro SL. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 187-193.
37. Fischer G, Conceicao FR, Leite FPL, et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1.Vaccine 2007; 25, 1250–1256.
38. 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): 167-172.
39. 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.
40. Park EH, Khang JH. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch Pharm Res* 1999; 22(4): 554-558.
41. Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostag Leukotr Ess* 1996; 55(3): 441-449.
42. 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): 332-338.
43. Yasuda T. Hyaluronan inhibits akt, leading to nuclear factor- κ B down-regulation in lipopolysaccharide stimulated U937 macrophages. *J Pharmacol Sci* 2011; 115(4): 509-515.
44. 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): 246-253.