

**ПРОПОЛИС-ИНДУЦИРАНА ЦИТОКИНОВА СЕКРЕЦИЯ ОТ ПЕРИФЕРНИ
ЛИМФОЦИТИ НА ЗДРАВИ ДОНОРИ**

Милена Драганова-Филипова, Виктория Сарафян
Катедра по биология, Медицински Университет-Пловдив
бул. Васил Априлов 15А, 4000 Пловдив, България
e-mail: milena_draganovafilipova@abv.bg

**PROPOLIS-INDUCED CYTOKINE SECRETION BY PERIPHERAL BLOOD
LYMPHOCYTES
FROM HEALTHY DONORS**

Milena Draganova-Filipova, Victoria Sarafian
Department of Biology, Medical university-Plovdiv
15A, V. Aprilov blvd, 4000 Plovdiv, Bulgaria
e-mail: milena_draganovafilipova@abv.bg

ABSTRACT

Cytokines are glycoproteins with major role in innate and adaptive immune responses. Some of them promote inflammation, whereas others have anti-inflammatory effects.

Many natural products have the ability to modulate the immune response. Propolis – the resin product from the vital activity of honey bees has similar potential. Recent studies have shown its ability to modulate immunity.

The aim of our study was to investigate the influence of this natural product on cytokine production from stimulated and non-stimulated peripheral blood lymphocytes (PBMC) from healthy donors.

Propolis from the region of the Rodopy Mountain was used. It was resolved in 96% ethanol. The final concentrations were 0,01; 0,1; 1,0; 10µg/ml. The first group of cells was not treated with propolis and was used as a control. The second group was treated only with propolis in different concentrations. In third group of cells was treated with propolis and stimulated with 2µg/ml lipopolysaccharide (LPS). The cytokine levels of IL1β, TNF-α, IL6 and IL10 were detected by ELISA method.

The results of our study show that propolis in all concentrations have strong inhibitory activity on all investigated cytokines, secreted by stimulated and non-stimulated with LPS cells.

The production of cytokines from PBMS treated with LPS and propolis was higher than that from non-stimulated cells.

The natural product can suppress IL1β and TNF-α in a dose dependent manner, which imposes its ability to decrease inflammation. The lowered level of IL6 and IL10 after propolis treatment can explain the potential of the natural product to modulate immune response by keeping the balance between pro- and anti-inflammatory molecules.

The decreased levels of Th1 (IL1β and TNF-α) and Th2 (IL6 and IL10) secreted cytokines from propolis treated PBMC suggest the immunomodulatory activity of Bulgarian propolis.

Key words: *propolis, cytokines*

Цитокините участват в сложна мрежа от междуклетъчни взаимодействия, осъществявайки комуникационни сигнали между клетките на имунната система и между имунната система и други органи. Част от тях са с про-, а други с антиинфламаторно действие. Доказано е, че активността им зависи от концентрацията, от типа на клетките, върху които действат и от присъствието на други цитокини или медиатори.

В зависимост от клетките, които ги секретират, цитокините се определят като Th1 и Th2 тип. Активацията и доминирането на клетъчен или хуморален имунитет зависи от баланса между двата типа медиаторни молекули.

Много вещества с естествен произход имат потенциала да променят имунния статус, насочвайки имунния отговор в определено направление. Прополисът е натурален продукт с доказани положителни ефекти върху имунната система. *In vivo* е проучен ефекта му върху естествената резистентност. На клетъчно ниво се активират фагоцитозата и цитотоксичността (1). Променя се секрецията на цитокини (TNF- α и IL-12) от активирани макрофаги, засилва се цитотоксичната активност на НК-клетките (2, 3). Индикация за активен клетъчно-медиран имунен отговор е фактът, че цитокините, отделяни от макрофагите след прилагане на прополис, активират Th към пролиферация и последваща стимулация на Tc и Treg лимфоцити (4).

Приложението на пчелния клей в практиката се основава на емпирични познания и не е изяснен механизма на действието му. Това насочи нашето проучване към възможността да се установи и сравни влиянието на прополис върху стимулирани и нестимулирани с бактериален липополизахарид лимфоцити от периферна кръв, изолирани от здрави донори. Изучаването на тези ефекти би позволило изясняване механизма на действие на натуралния пчелен продукт върху имунния отговор.

Материали и методи

Изследва се прополис от региона на източни Родопи, екстрахиран в 96% етанол. В работните концентрации 0,01; 0,1; 1; 10 $\mu\text{g/ml}$ количеството на етанола не надхвърля 0,1%. За стимулация на цитокинова секреция се използва бактериален липополизахарид (LPS), (Sigma) в работна концентрация 2 $\mu\text{g/ml}$.

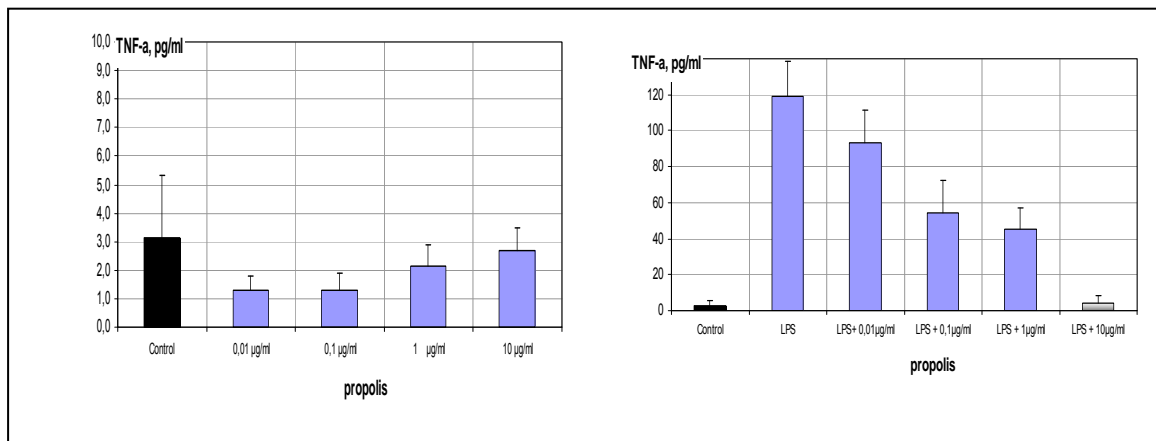
PBMC се изолират от 11 здрави донори. Всички са подписали декларация за информирано съгласие. Проучването е одобрено от Етична комисия на МУ-Пловдив. След градиентно центрифугиране, пръстенът от PBMC се промива и култивира в хранителна среда RPMI, без добавяне на серум. Клетките се засяват с концентрация $1,5 \times 10^6$ в 6-ямкови плаки. Работи се с 3 групи клетки – първата се третира с прополис в нарастващи концентрации. Към клетките от втората група, освен прополис се добавят 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Третата група на нетретирани клетки се използва за контрола. След 24 часова инкубация супернатантата се изолира и съхранява на -70°C до момента на анализа.

Количеството секретирани в супернатантата цитокини TNF- α , IL-1 β , IL-6 и IL-10 се изследва със специфични ELISA-китове (Biosorce). Абсорбцията се отчита на спектрофотометрично на ELISA reader при дължина на вълната 460/540 nm.

За оценка различията в ефектите на концентрациите на прополиса се прилага еднофакторен вариационен анализ. Достоверните различия се отчитат при ниво на значимост $p \leq 0,05$. Използва се статистическа програма SPSS 16.0.

Резултати и обсъждане

При всички изследвани концентрации нестимулираните с липополизахарид лимфоцити секретират цитокини в по-ниски концентрации от колкото след стимулация. Този основен компонент на клетъчна стена на Грам (-) бактерии се използва като потенциален активатор на макрофагите към цитокинова секреция.

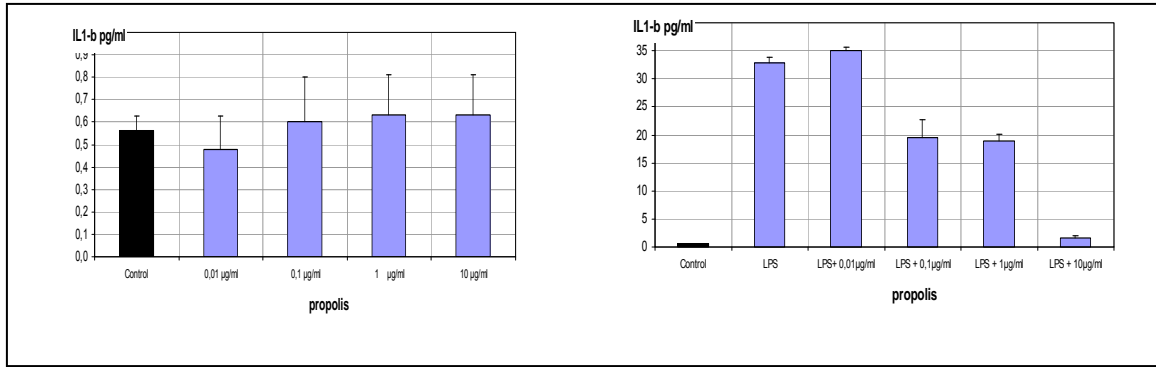


Фигура 1. Промяна в количеството на TNF- α , секретирани от лимфоцити, третирани с нарастващи концентрации прополис: А) нестимулирани с LPS; Б) стимулирани с 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

Промяната в количеството на секретирания TNF- α от PBMC, със или без стимулация с LPS, е представена на фигура 1. При нестимулирани с LPS лимфоцити в нито една от концентрациите на прополиса, стойностите на експресирания цитокин не надвишават тези на контролната група. Покачването му в третирани с нарастващи концентрации прополис клетки, макар и незначително, може да се тълкува като потенциална възможност на натуралния продукт да активира имунната система, въздействайки върху клетъчния и хуморалния имунен отговор. Възможно е в използваните концентрации прополисът неспецифично да стимулира имунната система. След стимулация с LPS, лимфоцитите повишават многократно възможността си за секреция на TNF- α .

При клетки, едновременно третирани с прополис и LPS, се наблюдава чувствително инхибиране на секретираното количество цитокин, което е доза-зависимо. С нарастване на концентрациите на прополис се засилва инхибиторната му активност върху цитокиновата секреция. Това е косвено свидетелство за противовъзпалителния ефект на прополиса. TNF- α притежава регулаторно и антитуморно действие. При високи концентрации в циркулацията предизвиква остро възпаление като индуцира продукцията на някои други възпалителни медиатори като IL-1, IL-6 (5).

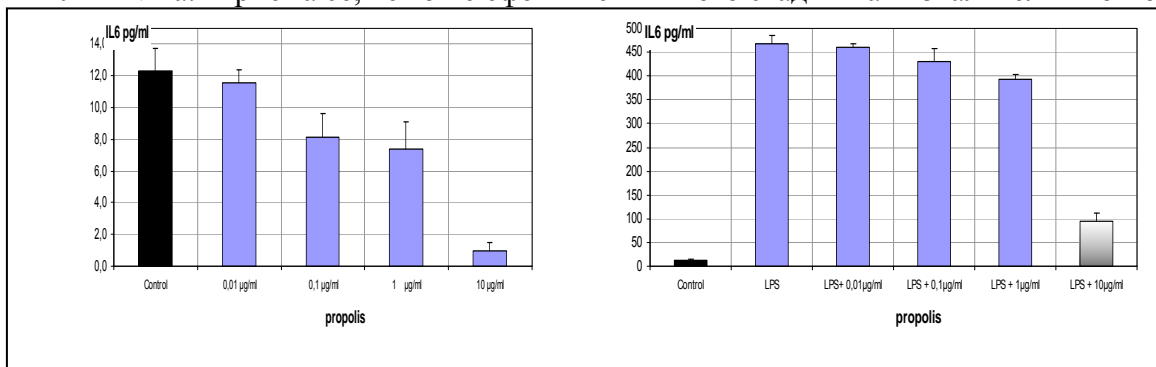
При третиране на PBMC с прополис, без стимулация с LPS, секрецията на IL1- β , независимо, че е по-висока от контролната, не е статистически значима. Слабата тенденция на покачване, наблюдавана и при TNF- α , е обяснима с често наблюдавания феномен на синергизъм между IL1 и TNF- α , който започва с едновременна секреция на двата цитокина локално, на мястото на възпалението. Освободените цитокини отключват поредица от взаимодействия, като контролират силата и продължителността на имунния отговор. При стимулация с LPS обаче, се наблюдава силно потискане на секреторната активност. Само най-ниската концентрация на прополис – 0,01 $\mu\text{g/ml}$ показва слаба активаторна активност, в сравнение със стимулираните само с LPS клетки. При нарастване на концентрациите се установява силно понижаване на цитокиновата секреция (фиг.2).



Фигура 2. Промяна в количеството на IL-1 β , секретирани от лимфоцити, третирани с нарастващи концентрации прополис: А) нестимулирани с LPS; Б) стимулирани с 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

TNF- α , заедно с IL-1 има синергичен ефект, като двата цитокина регулират активността на имунните клетки и отключват имунния отговор. Те са способни да индуцират възпаление, като повишават експресията на ендотелни адхезионни молекули, които имат важно значение за адхезията на лимфоцитите към ендотелната повърхност и така подпомагат миграцията им в тъканите. IL-1 β е основен медиатор на възпалителния отговор и участва в клетъчната пролиферация, диференциация и апоптоза. Развитието на възпалителната реакция зависи от баланса между проинфламаторните (TNF- α и IL-1 β) и антиинфламаторните (IL-4, 10, 13 и TGF- β 1) цитокини. Установено е, че при делеция на гените за IL-10 и TGF- β 1 в мишки се наблюдава спонтанно развитие на фатални възпалителни заболявания (6).

В нашето изследване изучаваме промяната в секрецията на Th2 секретирани IL-6 и IL-10. Промяната в секрецията на IL-6 е представена на фигура 3. Тенденцията за намаляване на цитокиновата секреция под влияние на прополис се наблюдава както при стимулирани, така и при нестимулирани с LPS клетки. При проследяване на промяната в секрецията на този цитокин се установява по-чувствително повлияване на нестимулираните клетки, IL-6 е многофункционален цитокин, който се освобождава от увредени клетки или при стимулация от IL-1 или TNF- α . Приема се, че той е ефективен в много стадии на възпалителния отговор.



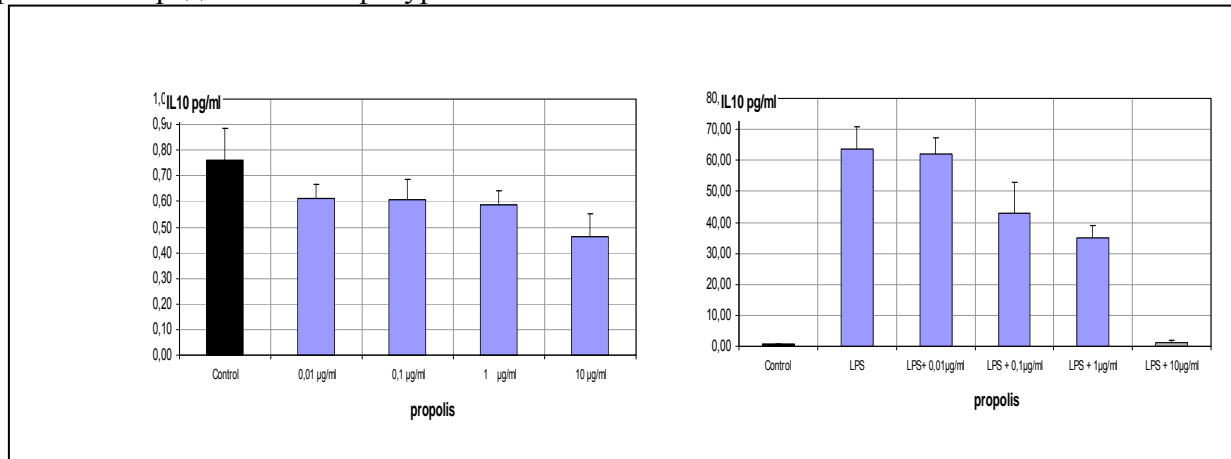
Фигура 3. Промяна в количеството на IL-6, секретирани от лимфоцити, третирани с нарастващи концентрации прополис: А) нестимулирани с LPS; Б) стимулирани с 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS.

Контролът и механизмът на освобождаване на IL-6 все още не са напълно изяснени. Клетъчният отговор се променя в зависимост от клетъчния тип и микробиоценозата (7).

IL-6 е плейотропен цитокин с множество ендокринни, паракринни ефекти и възможност за аутокринно действие. Притежава едновременно про- и анти- инфламаторна активност. Този цитокин индуцира крайното узряване на В-лимфоцитите в антитяло-продуциращи клетки. Установеното в нашето проучване понижаване на лимфоцит-

секреторния потенциал след третиране с прополис, предполага възможното участие на натуралния пчелен продукт в терапията на заболявания, предизвикани от производството на автореактивни антитела.

IL-10 е лимфокин, продуциран от Th, моноцити, макрофаги и В-лимфоцити, който *in vitro* е мощен инхибитор на цитокините (TNF- α , IL1, IL6, IL8), продуцирани от LPS-активирани моноцити и макрофаги (8). Промяната в секрецията му след третиране с прополис е представена на фигура 4.



Фигура 4. Промяна в количеството на IL-10, секретирани от лимфоцити, третирани с нарастващи концентрации прополис: А) нестимулирани с LPS; Б) стимулирани с 2 µg/ml LPS.

В нестимулирани клетки няма съществена и статистически значима промяна в секрецията на IL-10. При стимулирани с LPS обаче, се наблюдава значителна инхибиция на цитокиновата секреция. Подобни резултати са получени при изследване на IL-10 и от Ansorge, et al.(2007), макар че в тяхното проучване се установява разлика в секрецията на IL-10 от Т-лимфоцитната фракция и от РВМС. Това само потвърждава различния произход на този цитокин в двата вида клетъчни популации (8). Понижените нива на IL-10 продукцията след третиране с прополис, заедно с аналогичната секреция на IL-6, потвърждават противовъзпалителната активност на натуралния продукт.

Резултатите от нашето проучване се обединяват в следните изводи:

1. Прополисът повлиява цитокиновата секреция както на стимулирани, така и на нестимулирани с LPS РВМС, като при нестимулирани клетки секрецията е по-слаба, което потвърждава схващането, че LPS е неспецифичен активатор на имунния отговор.
2. Промяната в секрецията на TNF- α , IL-1 β от нетретирани с прополис клетки показва незначителни разлики с контролните клетки, но след третиране се очертава тенденция за слабо покачване, което предполага стимулиращ ефект на пчелния клей върху имунната система.
3. Секрецията на IL-6 силно се повлиява при прополисно третиране както в стимулирани, така и в нестимулирани клетки, което се свързва със силен супресивен ефект върху антияло-подукцията.
4. Промяната в секрецията на IL-10 предполага противовъзпалително действие на български прополис.

Получените в нашето изследване резултати затвърждават схващането, че прополисът може да повлиява както Th1-, така и Th2-зависима цитокинова секреция и по този начин да модулира имунния отговор.

Благодарност: Проучването е финансирано по проект ДУНК 01/2 от 28.12.2009 към МОМН.

Литература:

1. de Almeida E.C., Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J Venom Anim Toxins*, 2002, 8, 2, 191-212.
2. Orsi, R.O., Funari S.R.C., Soares A.M.V.C., Calvi S.A., Olivera S.L., Sforcin J.M., Bankova V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *J Venom Anim Toxins*, 2000, 6, 2, 205-219.
3. Sforcin J.M., R.Kaneno, S.R.C. Funari. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer. *J Venom Anim Toxins*, 2002, 8, 1, 19-29.
4. Ansorge S., Reinhold D., Lendeckel U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. *Z Naturforsch [C]*, 2003, 58, 580-589.
5. Baykal Y., Saglam K., Yilmaz M. I., Taslipinar A., Akinci S. B. Inal , A., Serum sIL-2r, IL-6, IL-10 and TNF-a level in familial Mediterranean fever patients. *Clin Rheumatol*, 2003, 22, 99–101.
6. Dinarello, Chales A, Proinflammatory cytokines. *Chest*, 2000,118, 503-508.
7. Opal S. M, DePalo V. A, Anti-inflammatory cytokines. *Chest*, 2000, 117, 1162-1172.
8. Takagi Y., Choi I.S., Yamashita T., Nakamura T., Suzuki I., Hasegawa T., Oshima M., Gu Y.H. Immune activation and radioprotection by propolis. *Am J Chin Med*, 2005, 33, 231-240.
9. Tilg H., Atkins M. Dinarello B.A., Mier J.W., Induction of circulating interleukin 10 by interleukin 1 and interleukin 2 but not interleukin 6 immunotherapy. *Cytokine*, 1995, 7, 7, 734–739.