



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROPOLİS YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU, İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİNİN MAKROFAJ HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

Toghrul SADIKHOV

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Ocak, 2022

İSTANBUL

Bu alışma, 14.01.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR
Yıldız Teknik Üniversite
Kimya - Metalurji Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2019-34785 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca yolumu aydınlatan, bilgi ve birikimi ile bana her zaman destek olan, fikirlerime önem veren, bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim sevgili danışmanım **Prof.Dr. E. Ş. Nazlı ARDA**'ya en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Bilgisi ve deneyimleriyle tez çalışmamı gerçekleştirmem için tüm aşamalarda beni cesaretlendiren, bana sabırla yol gösteren ve destek olan ikinci danışman hocam **Prof.Dr. Adil ALLAHVERDİYEV**'e, tez çalışmamın belirli aşamalarının yürütüldüğü Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümünde, sorularımı cevapsız bırakmayan, kendi deneyimlerini her zaman benimle paylaşan **Doç.Dr. Emrah Şefik ABAMOR**'a tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım **Prof.Dr. Evren ÖNAY UÇAR** ve **Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ**'e teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezde kullanılan propolis ücretsiz temin eden Kırklareli-Kıyıköy beldesi aracılarından Sayın **Cemal SATKIN** beyefendiye teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca, tüm bilgisini benimle paylaşan, sorularımı cevapsız bırakmayan YTÜ Biyomühendislik Bölümü Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarı Doktora öğrencisi **Msc. Sahar DİNPARVAR**'a ve Biyonanoteknoloji ve Biosensörler Laboratuvarından **Dr. Tayfun ACAR** ve **İrem ÇOKSU**'ya çok teşekkür ederim.

İÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Doktora öğrencilerinden **Msc. Yunus AKSÜT**'e istatistik hesaplamalarda verdiği destekten, Doktora öğrencisi **Msc. Gizem SÖNMEZ OSKAY**'a, propolis örneğinin elimize ulaşmasında verdiği destekten ve tüm **Proteomik ekibine** gösterdikleri dostluk ve verdikleri katkılardan ötürü çok teşekkür ederim.

Bu tezi, zorlu eğitim aşamalarım ve tüm hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, bana inanan, maddi-manevi desteklerini esirgemeyen aileme adanmıştır.

Ocak 2022

Toghrul SADIKHOV

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. PROPOLİS - “ARI TUTKALI”	5
2.1.1. Propolisin Bitkisel Kaynakları	5
2.1.2. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	6
2.1.3. Propolisin Fenolik İçeriği ve Flavonoidleri.....	7
2.1.4. Propolisin İçerdiği Önemli Bir Flavonoid: Kuersetin	10
2.1.5. Propolis Ekstrelerinin Hazırlanma Yöntemleri	11
2.1.6. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri ve Sağlık Üzerine Etkileri	12
2.2. İMMÜN SİSTEM, DOĞAL VE KAZANILMIŞ BAĞIŞIKLIK	17
2.2.1. Makrofajlar	18
2.2.2. Sitokinler, Tanımı ve Sınıflandırılması	20
2.2.3. NO, iNOS ve İmmün Yanıtla İlişkisi	21
2.3. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER.....	22
2.3.1. Nano Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemler	23
2.3.2. Farklı Nanopartikül Modelleri.....	24
2.3.3. Polimerik Nanoformülasyonların Hazırlanmasında Kullanılan Yöntemler	26
2.3.4. Polikaprolakton.....	27
2.3.5. Kapsüllenmiş Propolis ve Kuersetin Formülasyonlarının Etkinliği	27
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
3.1. PROPOLİS	29
3.2. KİMYASALLAR, TAMPONLAR, SOLÜSYONLAR	29
3.3. PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI	30

3.4. PROPOLİS VE KUERSETİN NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI.....	31
3.4.1. Propolis ve Kuersetin Nanopartiküllerinin Hazırlanması.....	32
3.5. HAZIRLANAN NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU	32
3.5.1. ZetaSizer Analizi	33
3.5.2. FTIR Analizi.....	33
3.5.3. SEM Analizi	33
3.5.4. XRD Analizi.....	33
3.5.5. Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi	34
3.5.6. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi	34
3.5.7. Etken Madde (İlaç) Yükleme Kapasitesi.....	34
3.5.8. Nanopartiküllerin <i>In Vitro</i> Etken Madde (İlaç) Salımı Analizi.....	35
3.6. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATTI	35
3.6.1. Makrofaj Hücrelerinin Kültürlenmesi	35
3.6.2. Hücre Sayımı	36
3.6.3. J774 Makrofaj Hücrelerinin Pasajlanması.....	37
3.6.4. Fare Makrofaj Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu	37
3.7. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI	37
3.8. PROPOLİSİN, KUERSETİNİN VE NANOPARTİKÜLLERİNİN SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ	38
3.9. PROPOLİS, KUERSETİN VE NANOPARTİKÜLLERİNİN İMMÜN YANIT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ	40
3.9.1. Griess Reaktifi ile NO Tayini.....	40
3.9.2. İmmün Yanıtla İlişkili Sitokinlerin Protein Düzeylerinin Ölçülmesi.....	40
3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRESİ.....	43
4.2. NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU	43
4.2.1. Nanopartiküllerin Boyutları.....	43
4.2.2. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyelleri.....	45
4.2.3. Nanopartiküllerin Çoklu Dağılım Endeksi (PDI) Değerleri.....	46
4.2.4. FTIR Analizi Sonuçları	47
4.2.5. Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri	49
4.2.6. XRD analizi sonuçları	51
4.2.7. Nanokapsüllemede Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Yükleme Kapasitesi	53

4.2.8. Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL Nanopartiküllerinin <i>In Vitro</i> Etken Madde (İlaç) Salımı	53
4.2.8.1. <i>Propolisin Kalibrasyon Eğrisi</i>	53
4.2.8.2. <i>Kuersetinin Kalibrasyon Eğrisi</i>	54
4.2.8.3. <i>Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'den Propolis ve Kuersetin Salımı</i>	55
4.3. J774 FARE MAKROFAJ HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA DURUMLARI	56
4.3. ETKEN MADDELERİN MAKROFAJ HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ	56
4.3.1. Sitotoksosite Analizleri	56
4.5. PROPOLİS, KUERSETİN, PROPOLİS-PCL VE KUERSETİN-PCL UYGULANMIŞ LPS-İNDÜKLÜ J774 MAKROFAJ HÜCRELERİNDEN NO SALIMI	61
4.6. PROPOLİS, KUERSETİN, PROPOLİS-PCL VE KUERSETİN-PCL UYGULANMIŞ LPS-İNDÜKLÜ J774 MAKROFAJ HÜCRELERİNDE IL-4, IFN-GAMA VE IL-1BETA DÜZEYLERİ	62
4.6.1. ELISA Standart Eğrileri	62
4.6.2. ELISA Sonuçları	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Propolisin içerdiği bazı fenolik bileşikler ve kimyasal formülleri (Huang ve diğ., 2014).....	9
Şekil 2.2: Günümüzde propolisin daha çok araştırılan ve ilgi gören farmakolojik aktiviteleri.....	13
Şekil 2.3: Brezilya kaynaklı kırmızı propolisin LPS ile uyarılmış makrofajlarda anti-enflamatuvar etkisi (Bueno-Silva ve diğ., 2015).....	15
Şekil 2.4: Doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerinde yer alan hücre tipleri (Sharpe ve Mount, 2015).	17
Şekil 2.5: Monositlerin fenotipleri farklı makrofajlara dönüşmesi – makrofaj polarizasyonu (Arango Duque ve Descoteaux, 2014).	19
Şekil 2.6: Çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanopartikül türleri (Mc Carthy ve diğ., 2015).	24
Şekil 2.7: İlaç molekülleri ile yüklenmiş nanokapsüllerin ve nanokürelerin şematik yapısı (Zielinska ve diğ., 2020).	25
Şekil 3.1: Propolis tuzaklarından (A) çıkartılan ham propolis örneği (B).	29
Şekil 3.2: Propolis etanol ekstresinden balmumu çökeltisinin santrifüjleme ile uzaklaştırılması: A-Sıvı fazın şeffaflaşması; B-balmumu içeren çökelti; C-Son santrifüj aşamasında balmumu çökeltisinin azalması.....	31
Şekil 4.1: Deneylerde kullanılan Propolis örneğinin (propolis etanolik ekstresinin) genel görünümü.....	43
Şekil 4.2: Propolis-PCL nanopartikülünün yoğunluk yüzdesine göre boyut dağılımı.....	44
Şekil 4.3: Kuersetin-PCL nanopartikülünün yoğunluk yüzdesine göre boyut dağılımı.	44
Şekil 4.4: Propolis-PCL nanopartikülünün Zeta potansiyel değerleri.	45
Şekil 4.5: Kuersetin-PCL nanopartikülünün Zeta potansiyel değerleri.	45
Şekil 4.6: Propolis-PCL nanopartikülünün boyut analizlerinde zamana göre korelasyon katsayısı değişimi.	46
Şekil 4.7: Kuersetin-PCL nanopartikülünün boyut analizlerinde zamana göre korelasyon katsayısı değişimi.	47

Şekil 4.8: Propolis (etanolik ekstresi), boş polikaprolakton (PCL) nanopartikülü ve Propolis-PCL nanopartikülünün FTIR spektrumları.	48
Şekil 4.9: Kuersetin flavonoidi, boş polikaprolakton (PCL) nanopartikülü ve Kuersetin-PCL nanopartikülünün FTIR spektrumları.	49
Şekil 4.10: Propolis-PCL nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri (A-2500X; B-10.000X).	50
Şekil 4.11: Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (A-75.000X; B-20.000X).	50
Şekil 4.12: Boş (ilaç yüklenmeyen) PCL nanopartiküllerinin XRD spektrumu.	51
Şekil 4.13: Propolis-PCL nanopartiküllerinin XRD spektrumu.	52
Şekil 4.14: Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin XRD spektrumu.	52
Şekil 4.15: Propolis (etanolik ekstre) için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.	54
Şekil 4.16: Kuersetin için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.	54
Şekil 4.17: Propolis-PCL nanopartiküllerinin zamana bağlı etken madde (ilaç) salım grafiği.	55
Şekil 4.18: Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin zamana bağlı etken madde (ilaç) salım grafiği.	55
Şekil 4.19: Kültürlenen J774 fare makrofaj hücrelerinin invert mikroskoptaki (Olympus CKX41) görüntüleri (A, B, C, sırasıyla 1., 2. ve 3. günlerde konfluent hücrelerdeki artışı göstermektedir).	56
Şekil 4.20: <i>E.coli</i> LPS'nin J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= "not significant", anlamlı değildir).	57
Şekil 4.21: Dimetil sülfoksitin J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= "not significant", anlamlı değildir).	57
Şekil 4.22: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 24. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, LPS grubuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= "not significant", anlamlı değildir).	58
Şekil 4.23: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 48. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, LPS grubuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= "not significant", anlamlı değildir).	59

Şekil 4.24: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 72. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (**P<0.01, ***P<0.001, LPS grupuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= “not significant”, anlamlı değildir).....	60
Şekil 4.25: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 96. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (**P<0.01, ***P<0.001, LPS grupuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= “not significant”, anlamlı değildir).....	61
Şekil 4.26: Standart nitrit kalibrasyon eğrisi.....	61
Şekil 4.27: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin LPS ile indüklenmiş makrofaj hücrelerinde NO salımı üzerine etkileri (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, LPS grupuna göre kıyaslama yapıldı; &P<0.05, &&P<0.01, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir).	62
Şekil 4.28: IL-4 sitokininin ELISA ile analizi için hazırlanan standart eğri.....	63
Şekil 4.29: IFN-γ sitokininin ELISA ile analizi için hazırlanan standart eğri.	63
Şekil 4.30: IL-1β sitokininin ELISA ile analizi için hazırlanan standart eğri.....	64
Şekil 4.31: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL uygulamalarının LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde IL-4 düzeylerine etkisi (**P<0.01, ***P<0.001, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= “not significant”, anlamlı değildir).....	64
Şekil 4.32: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL uygulamalarının LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde IFN-γ düzeylerine etkisi (***P<0.001, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir).	65
Şekil 4.33: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL uygulamalarının LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde IL-1β düzeylerine etkisi (*P<0.05, ***P<0.001, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir).	66

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Farklı coğrafi kökene ait propolis örneklerinin içerdiği karakteristik bileşikler (Bankova ve diğ., 2000).	6
Tablo 2.2: Türkiye'nin üç farklı bölgesinden toplanmış propolis örneklerinin GC-MS yöntemi ile içerik analizi (Sorkun ve diğ., 2001).	7
Tablo 2.3: Propolisin içeriğinde tespit edilmiş bazı flavonoidler.	8
Tablo 2.4: Propolis ekstraksiyonunda kullanılan çeşitli çözücüler ve çözdükleri bileşikler.	12
Tablo 2.5: Sitokinlerin sınıflandırılması (Ramani ve diğ., 2015).	21
Tablo 2.6: Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enziminin üç izoformu, aktivasyonu ve görev aldıkları önemli mekanizmalar.	22
Tablo 2.7: Polimerik nanokapsüllerin ve nanokürelerin üretiminde kullanılan bazı yöntemler.	26
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan başlıca kimyasallar.	30
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan başlıca tamponlar ve solüsyonlar.	30
Tablo 3.3: Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar – organik ve sulu fazlar.	32
Tablo 3.4: Çeşitli analizler için oluşturulan farklı deney grupları.	38
Tablo 4.1: Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin çoklu dağılım endeksi (PDI) değerleri.	46
Tablo 4.2: Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin Etken Yükleme Kapasiteleri, Reaksiyon Verimleri ve Enkapsülasyon Etkinliği.	53

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
g	: Gram
mg	: Miligram
L	: Litre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre
kDa	: Kilodalton
mV	: Milivolt
cm²	: Santimetre kare
M_w	: Molekül ağırlığı
rpm	: Dakikada devir sayısı
%	: Yüzde
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
ε	: Epsilon
°C	: Santigrat derece
~	: Yaklaşık
≥	: Büyük veya eşittir
≤	: Küçük veya eşittir

Kisaltmalar	Açıklama
AAS	: Atomik absorpsiyon spektroskopisi
ACE2	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (“Angiotensin converting enzyme 2”)
AIM2	: “Absent in melanoma 2”
<i>Apis mellifera</i> L.	: <i>Apis mellifera</i> Linnaeus
BAX	: “Bcl-2 ilişkili X (“Bcl-2 associated X”)

Bcl-2	: B-hücreli lenfoma 2 (“B-cell lymphoma 2”)
BCR	: B hücre reseptörü (“B-cell receptor”)
bZIP	: Bazik lösin fermuar (“Basic leucine zipper”)
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester (“Caffeic acid phenethyl ester”)
CLR	: C-tipi lektin reseptörü (“C-type lectin receptor”)
cNOS	: Konstitütif nitrik oksit sentaz (“Constitutive nitric oxide synthase”)
COX	: Siklooksijenaz (“Cyclooxygenase”)
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent deneyi (“Enzyme-linked immunosorbent assay”)
Elk1	: ETS (E-twenty six) transkripsiyon faktörü
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (“U.S. Food and Drug Administration”)
Fos	: Fos proto-onkogeni, AP-1(aktivatör protein 1) transkripsiyon faktörü subünitesi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (“Fourier transform infrared spectroscopy”)
GAGs	: Glikozaminoglikanlar
GC	: Gaz kromatografisi (“Gas chromatography”)
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (“Gas chromatography–mass spectrometry”)
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni-uyarıcı faktör (“Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”)
GPX2	: Glutasyon peroksidaz 2
Gsk3b	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta
HaCAT	: İnsan transforme keratinosit hücreleri (“Transformed human keratinocyte cells”)
HIF	: Hipoksiyle indüklenebilir faktör (“Hypoxia-inducible factor”)
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (“High performance liquid chromatography”)
HUVEC	: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (“Human umbilical vein endothelial cells”)
IκB	: NF-κB inhibitörü
IL	: İnterlökin
IFN	: İnterferon
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (“Liquid chromatography-mass spectrometry”)
LOX	: Lipoksigenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MCL-1	: Miyeloid hücre lösemi-1 (miyeloid lösemi hücre farklılaşması proteini 1) (“Myeloid cell leukemia-1”)
miRNA	: Mikro RNA
M.Ö.	: Milattan önce
mRNA	: Mesajcı RNA (“messenger RNA”)
MS	: Kütle spektrometrisi (“Mass spectrometry”)
Mtcp1	: Olgun T hücresi proliferasyon 1 (“mature T cell proliferation 1”)
MTT	: 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5- difenil tetrazolium bromür
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
Nfkb1	: Nükleer faktör kappa B subünitesi 1
NFE2	: Nükleer faktör, eritroidden türetilmiş 2
NFE2L2	: NFE2 benzeri bZIP transkripsiyon faktörü 2 (“NFE2 like bZIP transcription factor 2”)
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NOD	: Nükleotid-bağlayıcı oligomerizasyon domeni (“Nucleotide-binding oligomerization domain”)
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NP	: Nanopartikül
Pak1	: P21 (RAC1) ile aktive olan kinaz 1
PAMP	: Patojen-ilişkili moleküler kalıp (“Pathogen-associated molecular pattern”)
PBMC	: Periferik kandaki mononükleer hücreler (“Peripheral blood mononuclear cells”)
PCL	: Polikaprolakton (“poly-ε-caprolactone”)
Pdk1	: 3-Fosfoinositid-bağımlı protein kinaz 1 (“3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1”)
PEG	: Polietilen glikol
PGA	: Poliglikolik asit
PGE₂	: Prostaglandin E2
PLA	: Polilaktik asit (Polilaktit)
PLGA	: Polilaktik-ko-glikolik asit

PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAC1	: Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substrat 1 (“Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”)
Ras	: Rat sarkoma proteini (G-proteini türünde bir proto-onkogen)
RIG-I	: Retinoik asitle-indüklenebilir gen I (“Retinoic acid-inducible gene I”)
RNS	: Reaktif azot türleri (“Reactive nitrogen species”)
ROS	: Reaktif oksijen türleri (“Reactive oxygen species”)
RT-PZR	: Gerçek zamanlı (“Real time”)-PZR
siRNA	: Küçük enterferans yapan RNA (“Small interfering RNA”)
STAT3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (“Signal transducer and activator of transcription 3”)
SEM	: Taramalı elektron mikroskopisi / mikroskobu (“Scanning electron microscopy / microscope”)
TCR	: T hücre reseptörü (“T-cell receptor”)
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü (“Transforming growth factor”)
TLC	: İnce tabaka kromatografisi (“Thin-layer chromatography”)
TLR	: Toll-benzeri reseptör (“Toll-like receptor”)
TMPRSS2	: Transmembran proteaz serin proteaz 2
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TPA	: 12-O-Tetradekanoil-forbol-13-asetat (“12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate”)
UV-VIS	: Ultraviyole-görünür ışık (“Ultraviolet-visible”)
vb.	: Ve benzeri
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü (“Vascular endothelial growth Factor”)
y/s/y	: yağ/su/yağ
XRD	: X-ışını kırınımı (“X-ray diffraction”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PROPOLİS YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU, İMMÜNOMODÜLATÖR ETKİLERİNİN MAKROFAJ HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

Toghrul SADIKHOV

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

II. Danışman : Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, çeşitli arı ürünlerinin (bal, propolis, arı poleni vb.) ve içerdikleri bazı bileşiklerin önemli farmakolojik aktivitelere sahip olduklarını göstermiştir. Bu nedenle arı ürünleri, sağlıklı beslenme, apiterapi ve biyokozmetik üretimi gibi çeşitli alanlarda yoğun kullanım alanı bulmaktadır. Önemli bal arısı ürünlerinden biri olan ve 300'den fazla biyoaktif madde içeren propolis (arı tutkalı), içinde bulunduğumuz yüzyılda keşfedilen mükemmel doğal ilaç özellikleri ile daha da önem kazanmaktadır. Propolis, menşesine bağlı olarak şekerler, amino asitler, flavonoidler, fenolik asitler, yağ asitleri, alkoller, aldehitler ve steroidler gibi çeşitli bileşikler içerir. Propolisin biyolojik aktiviteleri genellikle zengin fenolik içeriğiyle ilişkilidir. Propolis ile içerdiği flavonoidlerden biri olan kuersetin, anti-alerjik, anti-mikrobiyal, anti-enflamatuvar, anti-kanser, anti-oksidan gibi çeşitli biyolojik özellikler taşır.

Güçlü yapışkan davranışı, keskin tadı ve suda az çözünmesi propolisin sağlığı destekleyici ürün olarak kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak ve biyoyararlanımı artırmak için, nanoteknolojik kapsülleme teknikleri kullanılabilir.

Bu tezde, propolis etanolik ekstresi, ticari kuersetin ve bunların polikaprolakton (PCL) ile kapsüllenmiş formlarının, immün yanıtla ilişkili bazı sitokinler (IL-4, IFN- γ ve IL-1 β) ve nitrik oksit (NO) düzeyleri üzerindeki etkileri J774 makrofaj hücre hattında incelendi.

Öncelikle yerli propolisten etanolik bir ekstre hazırlandı ve deneylerde Propolis örneği olarak bu ekstre kullanıldı. Daha sonra, ikili emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak propolis ekstresinin ve kuersetinin PCL ile enkapsüle edilmiş nanoformları (Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) üretildi. Nanopartiküllerin yapısı UV-VIS spektrofotometri, zeta potansiyeli ölçümü, FTIR, SEM ve XRD analizleri ile karakterize edildi. Çalışmanın sonraki aşamasında hazırlanan örneklerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) J774 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT yöntemi ile incelendi ve toksik olmayan konsantrasyonları belirlendi. J774 makrofaj hücrelerinde sitokinlerin anlatımı ve NO salınımı, *Escherichia coli* (serotype O111:B4) kaynaklı lipopolisakkaritin (LPS) toksik olmayan dozu uygulanarak indüklendi. Son olarak, Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde immün yanıtla ilişkili sitokinlerin (IL-4, IFN- γ ve IL-1 β) düzeyleri ELISA yöntemiyle saptandı. Ayrıca, immün yanıtın belirteçlerinden biri olan nitrik oksit (NO) salımı Griess reaksiyonu ile analiz edildi.

Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanoformülasyonları başarılı bir şekilde üretilerek karakterize edildi ve immünmodülatör etkileri Propolis ve Kuersetinin etkileriyle karşılaştırıldı. Test edilen konsantrasyonlarda (5, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$) tüm örneklerin LPS ile indüklenmiş J774 hücrelerinde NO salınımı inhibe ettiği belirlendi. Tüm örneklerin 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları IL-4 düzeyini artırırken nanoformların, en çok da Propolis-PCL'nin indüktif etkisi daha yüksekti. Propolis-PCL'nin sadece 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonu IFN- γ düzeyini artırdı. Ayrıca, IL-1 β düzeyini düşüren tek örneğin 100 $\mu\text{g/mL}$ Propolis olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada propolis ve içeriğindeki bileşenlerden biri olan kuersetin ile bu maddelerle yüklü polimerik nanopartiküllerin immünomodülatör etkilerine ilişkin önemli verilere ulaşıldı. Bu veriler gelecekte, immün yanıtla ilişkili sitokinlerin anlatımını ve NO salınımı hedef alan, biyoyararlanımı daha yüksek propolis nanoformülasyonlarının ve yeni arı ürünlerinin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Ocak 2022, 109 sayfa.

Anahtar kelimeler: Propolis, kuersetin, polikaprolakton, immün yanıt, sitokin.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF PROPOLIS-LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES, INVESTIGATION OF THEIR IMMUNOMODULATORY EFFECTS ON MACROPHAGE CELLS

Toghrul SADIKHOV

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA

Co-Supervisor : Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEV

Studies in cell cultures and animal models have shown that various bee products (honey, propolis, bee pollen, etc.) and some of the compounds they contain have important pharmacological activities. For this reason, bee products find intensive use in various fields such as healthy nutrition, apitherapy and biocosmetics production. Propolis (bee glue), which is one of the important honey bee products and contains more than 300 bioactive substances, becomes more important with its excellent natural medicine properties discovered in the current century. Depending on its origin, propolis contains various compounds such as sugars, amino acids, flavonoids, phenolic acids, fatty acids, alcohols, aldehydes, and steroids. Biological activities of propolis are generally associated with its rich phenolic content. Propolis, and one of its flavonoids, quercetin, have various biological properties such as anti-allergic, anti-microbial, anti-inflammatory, anti-cancer, anti-oxidant.

Its strong sticky behavior, pungent taste and low water solubility limit the use of propolis as a health-supporting product. To overcome these disadvantages and increase bioavailability, nanotechnological encapsulation techniques can be used.

In this thesis, the effects of propolis ethanolic extract, commercial quercetin and their polycaprolactone (PCL)-encapsulated forms on some immune response-related cytokines (IL-4, IFN- γ and IL-1 β) and nitric oxide (NO) levels were investigated in J774 macrophage cell line.

First, an ethanolic extract was prepared from local propolis and this extract was used as a Propolis sample in the experiments. Then, PCL-encapsulated nanoforms of propolis extract and quercetin (Propolis-PCL and Quercetin-PCL) were produced using the dual emulsion solvent evaporation method. The structure of the nanoforms was characterized by UV-VIS spectrophotometry, zeta potential measurement, FTIR, SEM, and XRD analyses. In the next stage of the study, the cytotoxic effects of the prepared samples (Propolis, Quercetin, Propolis-PCL and Quercetin-PCL) on J774 macrophage cells were examined by MTT method, and their non-toxic concentrations were determined. Expression of cytokines and release of NO in J774 macrophage cells were induced by administering a non-toxic dose of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (serotype O111:B4). Finally, the levels of immune response-related cytokines (IL-4, IFN- γ and IL-1 β) in Propolis, Quercetin, Propolis-PCL and Quercetin-PCL treated and untreated cells were determined by ELISA method. In addition, the release of nitric oxide (NO), one of the markers of immune response, was analyzed by the Griess reaction.

Propolis-PCL and Quercetin-PCL nanoformulations were successfully produced and characterized, and their immunomodulatory effects were compared with those of Propolis and Quercetin. It was determined that all samples at the tested concentrations (5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) inhibited NO release in LPS-induced J774 cells. While 100 $\mu\text{g/mL}$ concentrations of all samples increased the IL-4 level, the inductive effect of nanoforms, most notably Propolis-PCL, was higher. Only 50 $\mu\text{g/mL}$ concentration of Propolis-PCL increased the IFN- γ level. In addition, it was determined that the only sample that reduced IL-1 β level was 100 $\mu\text{g/mL}$ Propolis.

As a result, in this study, important data were obtained regarding the immunomodulatory effects of propolis and one of its components, quercetin, and polymeric nanoparticles loaded with these substances. In the future, these data may contribute to the development of more bioavailable propolis nanoformulations and new bee products that target the expression of immune response-related cytokines and NO release.

January 2022, 109 pages.

Keywords: Propolis, quercetin, polycaprolactone, immune response, cytokine.

1. GİRİŞ

Propolis, bal arılarının bitkilerden topladıkları reçineyi, tükürük bezlerinden salgıladıkları balmumu ve polenle karıştırarak ürettikleri bir üründür (Pietta ve diğ., 2002). Bal arısı *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera Apidae*) reçineyi ağaçların kabuğundaki çatlaklardan ve yaprak tomurcuklarından toplar (Burdock, 1998). Arılar propolisi kendi yuvalarının inşası ve adaptasyon için kullanmaktadırlar. Propolisin insanlar tarafından kullanımı ise çok eski tarihlere kadar uzanmaktadır. Örneğin, Mısırlılar mumyalamada anti-bakteriyel araç olarak kullanmışlar, çeşitli toplumlar sağlığa yararlı etkilerinden faydalanmışlardır (Kuropatnicki ve diğ., 2013). Propolis, immünomodülatör, anti-tümör, anti-enflamatuvar, anti-oksidan, anti-bakteriyel, anti-viral, anti-fungal ve anti-parazit gibi çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Sforcin ve Bankova, 2011).

Propolisle ilgili ilk bilimsel araştırma 1908 yılında basılmıştır ve bu yayında daha çok propolisin kimyasal özellikleri, içerdiği bileşikler ele alınmıştır (Helfenberg, 1908). Propolisin çeşitli ekstrelerinde yer alan kimyasal bileşiklerin yapıları son yıllarda NMR, GC, HPLC, TLC, MS, GC-MS ve LC-MS/MS gibi yöntemler kullanılarak aydınlatılmaya başlanmıştır (Pietta ve diğ., 2002; Sorucu ve Oruç., 2019; Bhargava ve diğ., 2021). Analitik yöntemlerde kaydedilen teknolojik gelişmeler sayesinde, propolisin içeriğinde 300'den fazla aktif bileşik tespit edilmiştir. Propolisin, menşesine bağlı olarak çeşitli şekerler, amino asitler, flavonoidler, fenolik asitler, yağ asitleri, alkoller, aldehytler, steroidler vb. içerdiği ortaya koyulmuştur (Righi ve diğ., 2013).

Propolisin biyolojik aktivitelerinin esasen içerdiği zengin fenolik bileşiklerle ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Moreno ve diğ., 2000). Türkiye'den toplanmış 19 farklı propolis örneğinin içerik analizleri yapılmış ve numunelerin apigenin, kuersetin, krizin, kampferol, kafeik asit, naringenin, galangin, kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve diğer bileşikleri içerdiği rapor edilmiştir (Degirmencioglu ve diğ., 2019).

Flavonol yapısındaki kuersetin doğal flavonoidlerin önemli üyelerindendir ve çok çeşitli meyve-sebzelerde bulunmaktadır (Kelly, 2011). Yapılan klinik çalışmalardan kuersetinin anti-alerjik, anti-mikrobiyal, anti-enflamatuvar, anti-kanser ve anti-oksidan aktivitelere sahip

olduğu ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Bischoff, 2008).

Fenolik bileşikler bakımından zengin propolisin makrofaj aktivasyonuna yol açarak bağışıklık sisteminde immünomodülatör etki gösterebildiği daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Sforcin, 2007). Makrofajlar yaygın olarak, konak hücrenin patojenlere karşı savunmasında (korunmasında) yer alan önemli hücreler olarak kabul edilir. Hasarlı dokulardan veya patojenlerden alınan sinyallerle makrofajlar doğrudan veya dolaylı şekilde organizmanın savunma mekanizmasına katılırlar (Franken ve diğ., 2016). Makrofajları uyarabilen potansiyel etkenlerden biri de Gram negatif bakterilerin dış membranlarının içerdiği lipopolisakkaritler (LPS)'dir ve bu komponentlerin makrofajlarda IL-1, IL-6, TNF- α gibi sitokinlerin anlatımını tetiklediği bilinmektedir (Meng ve Lowell, 1997).

Dimov ve diğ. (1991) propolisin suda çözünür türevinin peritoneal makrofajlardan IL-1'in salımını tetiklediğini *in vitro* olarak göstermişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar suda çözünür propolisin lenfosit proliferasyonunu önleyemediğini kanıtlayarak, ürünün non-spesifik bağışıklığı modüle ettiğini ortaya koymuşlardır.

Daha önce yapılan bir çalışmada, propolisin de içerdiği flavonoidlerden olan kuersetinin, LPS ile uyarılmış makrofajlardan NO ve TNF- α salımını inhibe ettiği rapor edilmiştir ve kuersetin kronik enflamasyon hastalıklarda kullanılmak üzere ilaç geliştirilmesinde potansiyel bir bileşik olarak önerilmiştir (Manjeet ve Ghosh, 1999).

Günümüzde sağlık sektöründe ve ilaç endüstrisinde, hedeflenen bölgeye daha etkin bir şekilde ilaç taşınmasını temin etmek için çeşitli uygulamalarda, terapötik ajanların (örneğin, proteinler, peptidler, ilaç molekülleri, siRNA) kapsüllenmesinde nanopartiküller yaygın olarak kullanılmaktadır (Ong ve diğ., 2017). Nanopartiküllerin en önemli avantajları, kan dolaşımında uzun süre kalmaları, belirli dozlarla ilaç salımını sağlamaları ve boyutlarından dolayı dokuya kolayca nüfuz etmeleridir. Hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde metalik, organik, inorganik ve polimerik nanoformülasyonlar tercih edilir (Patra ve diğ., 2018).

Kontrollü ilaç salımı, küçük boyutları, ikili kombine edilebilme özellikleri, ilaç moleküllerini hedef bölgeye kadar koruyabilmeleri gibi özelliklerinden dolayı son birkaç yılda polimerik nanokapsüller ve nanoküreler araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Polimerik nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve biyouyumluluk

özelliklerinden dolayı doğal polimerler, kontrol edilebilir kimyasal yapılara sahip olma avantajlarından dolayı ise sentetik polimerler tercih edilebilir (Crucho ve Barros, 2017). Birçok ilaç molekülünü içine alabilmesi, toksik olmaması, biyobozunurluk ve diğer özellikleri polikaprolakton (PCL) isimli alifatik poliesteri polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında elverişli kılmaktadır (Sinha ve diğ., 2004).

Türkiye’de daha önceden yapılmış bir çalışmada, gümüş nanopartiküllerde kapsüllenmiş kuersetinin, LPS ile uyarılmış BV-2 mikrogliya hücrelerinde, proenflamatuvar prostaglandin E2, nitrik oksit (NO), COX-2, indüklenbilir nitrik oksit sentaz mRNA’sı ve protein düzeylerini belirgin şekilde düşürdüğü rapor edilmiştir ve bu nanoformülasyonların nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlayabileceği ileri sürülmüştür (Ozdal ve diğ., 2019).

Yapılan başka bir çalışmada, silika ile kapsüllenmiş kuersetin nanopartiküllerinin, anti-enflamatuvar ve anti-oksidan özelliklerini koruduğu kanıtlanmıştır (Lee ve diğ., 2016a).

Propolisin insanlar tarafından tüketimini zorlaştıran bazı özelliklerini (güçlü bir şekilde yapışkan olması, keskin tadı, az çözünmesi gibi) ortadan kaldırmak ve biyoyararlanımı artırmak üzere kapsülleme teknikleri kullanılmıştır (Li ve diğ., 2010). PCL ve pluronik F-108 polimerleri ile kombine şekilde (matriks sistem) kapsüllenmiş Brezilya kırmızı propolisinin etanolik ekstratlarını içeren nanopartiküllerin anti-oksidan aktivitesi ve *Leishmania (V.) braziliensis* üzerinde sitotoksik etkisi araştırılmış, bu nanoformülasyonlar leishmania hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilecek ilaçların hazırlanmasında potansiyel ara ürünler olarak önerilmiştir (Do Nascimento ve diğ., 2016).

Daha çok antibakteriyel, anti-oksidan aktiviteler üzerine yapılan çalışmalarda, PCL ile diğer maddelerin (jelatin, kitosan, PLA, selüloz asetat) kombinasyonundan oluşan matriks sistemlerinde kapsüllenmiş propolisin daha etkin olduğu kanıtlanmıştır (Khoshnevisan ve diğ., 2019; Eskandarinia ve diğ., 2020; Son ve diğ., 2021; Romero ve diğ., 2021).

Literatürde PCL ve diğer polimerlerden oluşan kombine matriks sistemlerinde kapsüllenmiş propolisin bazı aktiviteleri üzerine çalışmalar mevcut olsa da, sadece PCL (poly-ε-caprolactone) polimeri ile nano boyutta kapsüllenmiş propolis ve bu nanoformların immün yanıtındaki rolüne ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, konuyla ilgili mevcut bilgiler referans alınarak, propolisin etanolik ekstresi ile içeriğindeki flavonoidlerden biri olan kuersetinin ve bunların PCL ile enkapsüle edilmiş formlarının, immün yanıt üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi hedeflenmiştir.

Önce Kırklareli'nin Vize ilçesine bağlı bir balıkçı kasabası olan Kıyıköy'deki üreticiden propolis temin edilmiş ve etanolik ekstre hazırlanmıştır. Bu aşamayı, propolis etanolik ekstresinin ve ticari olarak elde edilmiş kuersetin flavonoidinin PCL polimeri ile kapsüllenmesi ve sırasıyla Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin hazırlanması izlemiştir. Nanoformülasyonların karakterizasyonu UV-VIS spektrometri, zeta potansiyeli ölçümü, FTIR, SEM ve XRD analizi yöntemleriyle yapılmıştır. *In vitro* araştırmaların yapılacağı J774 makrofaj hücre kültürü kurularak Propolis (etanolik ekstre), Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin bu hücreler üzerindeki toksik etkileri MTT testiyle araştırılmış, toksik olmayan konsantrasyonları belirlenmiştir. Hücrelerde immün yanıtın aktivasyonunu sağlamak ve sitokin anlatımları ile NO salımını indüklemek için *E. coli* (serotype O111:B4) kaynaklı lipopolisakkarit (LPS) kullanılmıştır. Bu ajanın etkin ve toksik olmayan konsantrasyon limitleri yine MTT testiyle tayin edilmiştir. Son aşamada, dört ürünün (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) immün yanıtla ilişkili sitokinler üzerindeki etkileri protein düzeyinde ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. LPS-indüklü hücresel nitrik oksit (NO) salımının ölçümünde ise Griess reaksiyonundan yararlanılmıştır. Kullanılan materyale, malzemelere ve yöntemlere ilişkin ayrıntılı bilgiler Malzeme ve Yöntem kısmında verilmiştir.

Yerli bir propolis örneğinden hazırlanmış etanolik ekstre ilk kez bu çalışmada PCL esaslı nanopartikül formunda üretilerek karakterize edilmiştir. Propolis ekstresi, kuersetin ve nanoformlarının immün yanıtla ilişkili bazı sitokinlerin anlatımı üzerindeki etkileri yine ilk kez bu çalışmada incelenmiştir. Elde edilen bulguların biyoyararlanımı daha yüksek, immünomodülatör özellikte yeni arı ürünlerinin geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PROPOLİS - “ARI TUTKALI”

Yunanca’daki “Pro” (karşısında, girişinde) ve “Polis” (şehir, toplum) kelimelerinden türeyen Propolis kelimesi şehrin (arı kovanına benzetme) savunması için gereken “madde”yi ifade etmektedir. Ham propolisin bazen “arı tutkalı” olarak isimlendirilmesinin nedeni, soğukken sert ve mum gibi, sıcakta ise yumuşak ve çok yapışkan olmasıdır. Bal arıları (*Apis mellifera* L.) bitkilerden salgılanan reçineli maddeleri, bitkilerin çatlaklarından sızan müsilajları (zamk), lipofilik maddeleri ve diğer bazı maddeleri toplayarak kendi tükürük bezlerinden salgıladıkları β -glikozidaz enzimiyle karıştırırlar ve ham propolisi üretirler (De Groot, 2013).

Bal arıları, topladıkları propolisi kovanın onarılması, ince kısımların güçlendirilmesi, kovana saldıran “yabancı istilacıların” dışarı taşınamayan kadvralarının “mumyalanması” için kullanırlar. Propolisin geleneksel halk hekimliğinde insanlar tarafından kullanımının tarihçesi M.Ö. 300. yıla kadar uzanır (Toreti ve diğ., 2013).

2.1.1. Propolisin Bitkisel Kaynakları

Doğal ürünün bitkisel kaynaklarını bilmek, onun içerik analizleri ya da kimyasal standardizasyonu için önem arz etmektedir. Aynı zamanda, arıcılar propolisin bitki kaynağını bilerek, arı kovanları çevresinde uygun bitkilerin olduğundan emin olabilirler. Örneğin, kuzey Rusyada huş ağacı (*Betula verrucosa*) ve titrek kavak (*Populus tremuloides*) ağaçlarının propolis için esas kaynak olduğu rapor edilmiştir (Bankova ve diğ., 2000). Kavak (*Populus*) cinsinin ılıman bölgelerden toplanan propolis için önemli bir bitkisel kaynak olduğu bilinmektedir. Özellikle bu cinse ait *Populus nigra* L. (karakavak), *Populus deltoides* L. ve *Populus fremontii* türlerinden toplanan propolis “kavak-tipi-propolis” olarak isimlendirilir ve daha çok Avrupa (Akdeniz’deki bazı bölgeler hariç), Kuzey Amerika, Asyanın tropik olmayan bölgelerinde (Çin dahil) bulunur (De Groot, 2013).

Çeşitli propolis örneklerinin kimyasal içerikleri, işçi arının bitkisel salgıları topladığı bitki kaynağına göre büyük farklılık gösterebilir (Castaldo ve Capasso, 2002; Kumazawa ve diğ., 2004). Mevsim, yükseklik, ışıklanma, beslenme olanakları gibi dış etkenler de propolis örneklerinin kimyasal içeriğinde farklılık yaratabilir (Katircioglu ve Mercan, 2006; Silici ve Kutluca, 2005). Propolisin kimyasal karakterizasyonu TLC, HPLC veya GC gibi yöntemlerle

yapılabilir. Farklı bitki kaynağına ait propolis örneklerinin içerdiği tipik bileşikler Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Farklı coğrafi kökene ait propolis örneklerinin içerdiği karakteristik bileşikler (Bankova ve diğ., 2000).

Coğrafi köken	Bitki kaynağı	İçerdiği karakteristik bileşenler
Avrupa, Asya, Kuzey Amerika	<i>Populus</i> spp. (Kavak)	Krizin, galangin, benzil, feniletil, prenil, pinosembirin, pinobanksin
Kuzey Rusya	<i>Betula verrucosa</i> (Huş ağacı)	Apigenin, ermanin, kaemferid, ramnositrin, akasetin
Brezilya	<i>Baccharis</i> spp. <i>Araucaria</i> spp.	Diterpenik asitler, p-kumarik asit, asetofenonlar
Kanarya Adaları	Bilinmeyen	Furoruran lignanlar

2.1.2. Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Doğal propolis lipofiliktir ve katı formdadır, ısıtıldığı zaman yumuşak ve çok yapışkan bir hal alır (Hausen ve diğ., 1987). Dondurulmuş propolis serttir ve 25-45°C sıcaklıkta esnek ve yapışkandır. Propolis 60-70°C’de sıvıya dönüşebilir, ancak bazı propolis örnekleri için erime noktası 100°C’dir. Kökeni ve reçine içeriğine göre propolisin rengi değişebilir. Genellikle propolisi çözmek için metanol, etanol, aseton, kloroform, su, diklorometan gibi çözücüler kullanılmaktadır (Wagh, 2013).

Yüzlerce bileşik içeren propolis, yaklaşık olarak %50 reçine ve balsam, %30 mum, %10 esansiyel ve aromatik yağlar, %5 polen ve %5 kalıntılardan oluşmaktadır (Thomson, 1990). Farklı bölgelerden toplanmış propolisin içeriğinde fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar, esterler, diterpenler, seskiterpenler, aromatik aldehitler, amino asitler, alkoller, yağ asitleri, vitaminler ve mineraller tanımlanmıştır (Batista ve diğ., 2012). Propolis toplandığı bitki kaynağına, dolayısıyla coğrafi kökenine göre farklı içeriklere sahip olduğu gibi, ekstraksiyon yöntemleri de ürünün besin profilini değiştirebilir (Braakhuis, 2019).

Türkiye’de 3 farklı bölgeden (Erzurum, Gümüşhane, Trabzon) toplanmış propolis örneklerinin GC-MS yöntemiyle içerik analizi yapılmış ve coğrafi kökenine göre örneklerde farklı miktarlarda alkoller, aromatik asit esterleri, flavonoidler, ketonlar ve diğer bileşiklerin olduğu rapor edilmiştir (Tablo 2.2) (Sorkun ve diğ., 2001).

Tablo 2.2: Türkiye’nin üç farklı bölgesinden toplanmış propolis örneklerinin GC-MS yöntemi ile içerik analizi (Sorkun ve diğ., 2001).

Bileşikler	Erzurum (%)	Gümüşhane (%)	Trabzon (%)
Alkoller	21.73	11.30	15.03
Alifatik Asitler	1.96	0.98	3.1
Amino Asitler	4.46	-	-
Aromatik Asit Esterleri	31.86	5.52	5.12
Aromatik Asitler	1.32	2.18	3.35
Aromatik Aldehitler	2.24	1.05	0.95
Flavonoidler	4.72	50.55	43.55
Ketonlar	8.19	11.11	21.30
Diğer Bileşikler	20.21	13.31	7.87
Terpenoidler	3.31	çok düşük	çok düşük

Makedonya’dan toplanmış propolis örneklerinde Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi (AAS) ile yapılan metal analizlerinde Ca, Mg, Na, K, Zn ve Fe; Küba’dan toplanmış propolisin etanolik ekstratlarında ise Fe, Mn, Zn ve Cu mineralleri tespit edilmiştir (Kulevanova ve diğ., 1995; Bankova ve diğ., 2000).

2.1.3. Propolisin Fenolik İçeriği ve Flavonoidleri

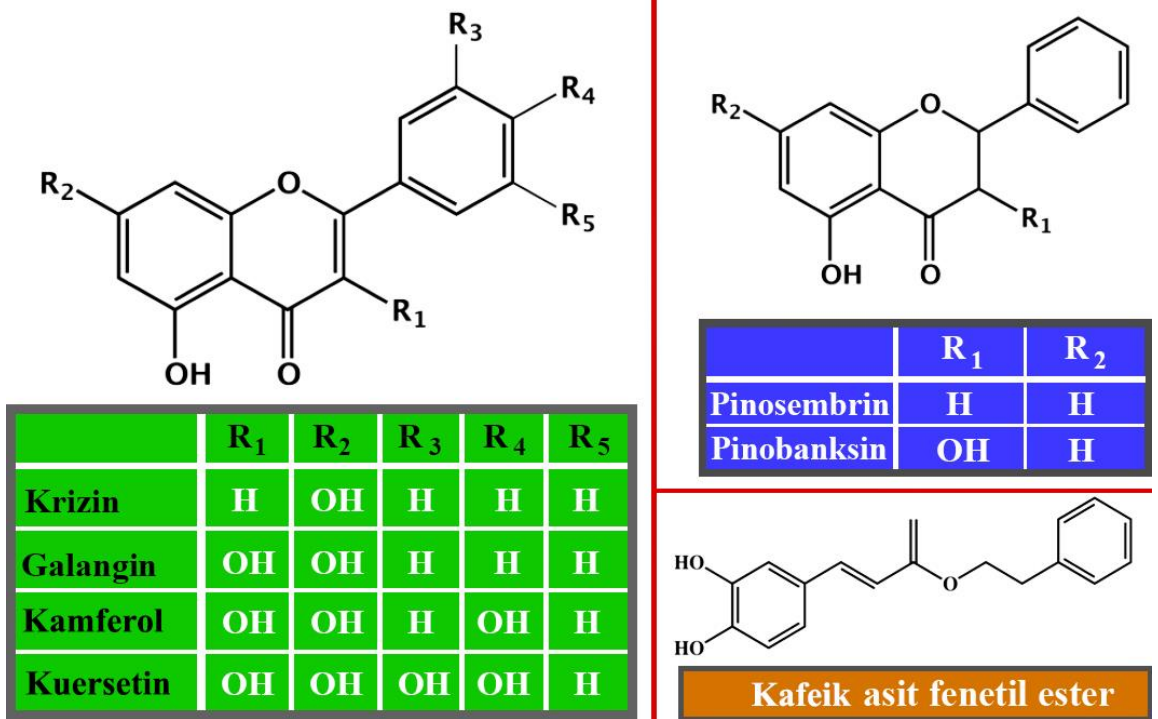
Fenolik bileşikler, fenoller, fenolik asitler, stilbenler, lignanlar, ligninler, kumarinler ve flavonoidler gibi gruplarda sınıflandırılabilir (Naczk ve Shahidi, 2004). Bitkilerde bulunan flavonoidlerin tüm polifenollerin %60’ını kapsayan, 4000’den fazla farklı molekülü içeren büyük bir aile olduğu bilinmektedir (Madunic ve diğ., 2018). Flavonoidler 8 esas grupta incelenebilir: flavonlar, flavonollar, izoflavonlar, flavan-3-ol’lar, flavanonlar, flavanonoller,

antosiyandinler ve kalkonlar (Martinez ve diğ., 2019). Çeşitli bölgelerden toplanarak içerik analizi yapılmış propolis örneklerinin içerdiği önemli flavonoidler Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3: Propolisin içeriğinde tespit edilmiş bazı flavonoidler.

Flavonlar	İlgili literatür
Luteolin, Heksametoksi flavon, 6-Sinnamilkrisin	Cao ve diğ., 2004; Usia ve diğ., 2002; Hegazi ve Abd El Hady, 2002
Flavonollar	İlgili literatür
Kuersetin, Macarangin, 2'-Geranilkuersetin, 2'-(8"-Hidroksi-3", 8"-dimetil-oct-2"-enil)-kuersetin, (7"R)-8-[1-(4'-Hidroksi-3'-metoksifenil)prop-2-en-1-il]-galangin	Inui ve diğ., 2012; Petrova ve diğ., 2010; Li ve diğ., 2010; Guzelmeric ve diğ., 2018
İzoflavonlar	İlgili literatür
Odoratin, Kalikosin, Medikarpin, Homopterokarpin, 7,4'-Dihidroksiisoflavon, 4',7-Dimetoksi-2'-isoflavonol	Alencar ve diğ., 2007; Shrestha ve diğ., 2007; Li ve diğ., 2008
İzoflavanlar	İlgili literatür
(3S)-Vestitol, (3S)-Isovestitol, (3S)-7-O-Metilvestitol, (3S)-Mukronulatol, 7,4'-Dihidroksi-2'-metoksiisoflavone, Neovestitol	Li ve diğ., 2008; Piccinelli ve diğ., 2005; Campo Fernandez ve diğ., 2008
Flavanonlar	İlgili literatür
(2S)-Naringenin, Alnustinol, Garbanzol, (2S)-Liquiritigenin, 7-O-Prenilpinosembrin	Li ve diğ., 2008
Kalkonlar	İlgili literatür
3,4,2',3'-Tetrahidroksikalkon, Isoliquiritigenin, 4,4'-Dihidroksi-2'-metoksikalkon	Righi ve diğ., 2011; Li ve diğ., 2008
Flavonoid Glikozidleri	İlgili literatür
Kuersetin-3-O-glukozit, Kamferol-3-O-rutinosid, Isoramnetin-3-O-rutinosid	Falcao ve diğ., 2013

Flavonoidler bitkilerde doğal olarak bulunan ikincil metabolitlerdir ve şikimik asit ile asetat-malonat yollarının kombine biyosentezi sayesinde ortaya çıkabilirler (Castellano ve diğ., 2013). Flavonoidlerin kimyasal yapısı on beş karbondan oluşan iskelete dayalıdır ve aynı sınıfa ait olan flavonoidler A ve B zincirlerinin fonksiyonel gruplarına göre farklılık göstermektedir. Bitki hücrelerinin vakuollerinde biriken flavonoidler genellikle glikozitler şeklinde ortaya çıkarlar ve yapısal farklılıkları halkalardaki hidroksilasyon, metoksilasyon ve glikozilasyon ile ilişkilidir (Şekil 2.1) (Amic ve diğ., 2007).



Şekil 2.1: Propolisin içerdiği bazı fenolik bileşikler ve kimyasal formülleri (Huang ve diğ., 2014).

Propolisin içerdiği önemli bileşenler olan flavonoidlerin anti-enflamatuvar, anti-kanser, anti-oksidan, anti-viral, anti-diyabetik, yaşlanma karşıtı gibi çok sayıda farmakolojik aktiviteleri bilinmektedir ve ılıman bölgelerde propolisin içerdiği flavonoid miktarı onun kalitesini değerlendirmek için bir kriter olarak kullanılır. Bu bölgelerden toplanmış propolis örneklerinin kimyasal yapısında krizin, galangin, pinosembrin ve pinobanksin gibi flavonoidler karakteristik bileşikler olarak tanımlanabilir (Daubney ve diğ., 2015; Huang ve diğ., 2014). Kafeik asit fenetil ester propolisin içerdiği en önemli polifenolik bileşiklerden biridir ve yara iyileştirme, anti-enflamatuvar, anti-diyabetik, anti-kanser gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Olgierd ve diğ., 2021).

Pietta ve diğ. (2002) HPLC ve MS yöntemlerini kullanarak çeşitli propolis ekstraktlarının içeriğindeki kuersetin, galangin, krizin, pinosembirin, naringenin, kamferol gibi flavonoidlerin varlığını kanıtlamışlardır. Yapılan çalışmalarda Brezilya'dan toplanmış propolis örneklerinde kaempferid, izosakuranetin, formononetin, izoliquiritigenin, liquiritigenin, medikarpin, biokanin-A flavonoidleri, prenillenmiş fenilpropanoidler, prenillenmiş p-kumarik asitler, asetofenonlar, diterpenik asitler tespit edilmiştir (Bankova, 2005; Park ve diğ., 2002; Da Silva Frozza ve diğ., 2013; Silva ve diğ., 2008).

2.1.4. Propolisin İçerdiği Önemli Bir Flavonoid: Kuersetin

Kuersetin kelimesi menşei Latince'deki "quercetum" kelimesinden almıştır ve "pelit ormanı" anlamına gelmektedir. Bitkisel bir sekonder metabolit olan kuersetin turuncgiller, kırmızı soğan, üzüm, elma, çilek, kiraz, brokoli gibi çeşitli insan gıdalarının içeriğinde bulunur. Kuersetin (3,3',4',5,7-Pentahidroksiflavon) hesperedin, rutin (glikozillenmiş kuersetin) ve naringenin gibi diğer birçok flavonoid için temel oluşturmaktadır. Bu flavonoid sarı renklidir ve sıcak suda az çözünse de, alkol ve lipidlerde tam olarak çözünmektedir (David ve diğ., 2016).

Diğer birçok flavonoidin oral biyoyararlanımı düşük olduğu için, kuersetinin organizmada emilimi birçok araştırmada merak konusu olmuştur. Doğal kuersetinin biyoyararlanımı şeker kısmı ile ilişkilidir. Kuersetin bitkilerde daha çok glikozillenmiş şekilde bulunduğu için, doğrudan emilimi kolay değildir. Ancak yapılan deneysel çalışmalar, kuersetin glikozitlerinin ince bağırsakta bakteriyel enzimlerden bağımsız olarak etkili biçimde hidrolize olabildiğini ve bundan sonra aglikon kuersetinin emiliminin % 65-81 arttığını göstermektedir. Günlük 0.5-1 g kuersetin kullanımının insan sağlığına yararlı olduğu öne sürülmektedir (Graefe ve diğ., 2001; Walle ve diğ., 2000; Bischoff, 2008).

Bitkilerde anahtar ikincil metabolitlerden olan kuersetin flavonoidinin sağlık üzerine bir dizi yararlı etkileri vardır. Okoko ve Oruambo (2009) kuersetinin ve metaboliti olan 3-O-metil kuersetinin *E.coli* (055:B5) LPS ile uyarılmış U937 hücrelerinde IL-1 sitokin salgılanmasını ve makrofaj aktivasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Kuersetinin anti-enflamatuvar etkisi üzerine araştırma yapan Xiong ve diğ. (2019), bu flavonoidin dış eti fibroblast hücrelerinde IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α üretimini azalttığını tespit etmişlerdir.

Lee ve diğ. (2016b) kuersetinin enzimatik yolla sentezlenmiş – glikozillenmiş türeği olan kuersetin 3-O-ksilositin (Quer-xyl) makrofaj aktivasyonunu gerçekleştirerek TNF- α ve IL-6 salımını tetiklediğini ve glikozillenmiş kuersetinin immünoestimulan etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Literatürde kuersetinin enflamasyona yol açan COX ve LOX enzimlerini inhibe ettiği bilgisi de yer almaktadır (Yang ve diğ., 2020a).

Bazı çalışmalarda kuersetin potansiyel adjuvan (destekleyici), immünoestimulan, anti-oksidan, anti-mikrobiyal ve anti-alerjik terapötik ajan olarak önerilmiştir. (Singh ve diğ., 2017; Park ve diğ., 2009; Lesjak ve diğ., 2018; Li ve diğ., 2009). NO, ROS, Akt, NF- κ B, kaspaz-3, kaspaz-9, MCL-1, Bcl-2 ve BAX yollarını modüle etme özelliğine sahip kuersetinin anti-kanser etkisi de kanıtlanmıştır (Tang ve diğ., 2019; Ward ve diğ., 2018; Gao ve diğ., 2012).

2.1.5. Propolis Ekstrelerinin Hazırlanma Yöntemleri

İnsan sağlığına yararlı çok sayıda farmakolojik aktiviteye sahip propolisin ekstraksiyonu için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Ham propolis kompleks yapıda, zengin bir içeriğe sahip fakat çözünürlüğü düşük doğal bir ürün olduğu için doğrudan kullanılamaz ve propolisin içerdiği yararlı bileşikler izole etmenin en basit yolu çeşitli çözücülerle ekstraksiyondur (Pietta ve diğ., 2002). Literatürde propolisin daha çok etanol, metanol gibi alkollerle ekstraksiyonuna rastlansa da, suda, yağda ve diğer çözücülerde hazırlanmış ekstraktlar da deneylerde kullanılmıştır. Tüm ekstraksiyon yöntemlerinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları vardır (Kubiliene ve diğ., 2015). Ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin ham propolis içeriğindeki belli grup bileşikler daha kolay veya spesifik çözme özelliği bulunmaktadır (Tablo 2.4) (Fokt ve diğ., 2010). Bu nedenle, ekstraksiyonda kullanılan farklı çözücüler ve yöntemler, propolis preparatlarının standardizasyonunu güçleştirebilmektedir (Cunha ve diğ., 2004).

Az miktarda balmumu içeren ve biyolojik aktif bileşiklerce zengin propolis ekstraktlarının hazırlanmasında en yaygın kullanılan çözücü etanol olduğu için, bu çözücüye dayalı yöntem propolis ekstraksiyonunda geleneksel yaklaşım olarak tanımlanmaktadır (Devequi-Nunes ve diğ., 2018). Ancak, daha sonradan su, süperkritik akışkan, asetonitril, doğal derin ötektik çözücüler, çift katmanlı katı faz ve diğer ekstraksiyon yöntemleri de denenmiş ve geliştirilmiştir (Mello ve diğ., 2010; Danert ve diğ., 2014; Oellig, 2016; Funari ve diğ., 2019).

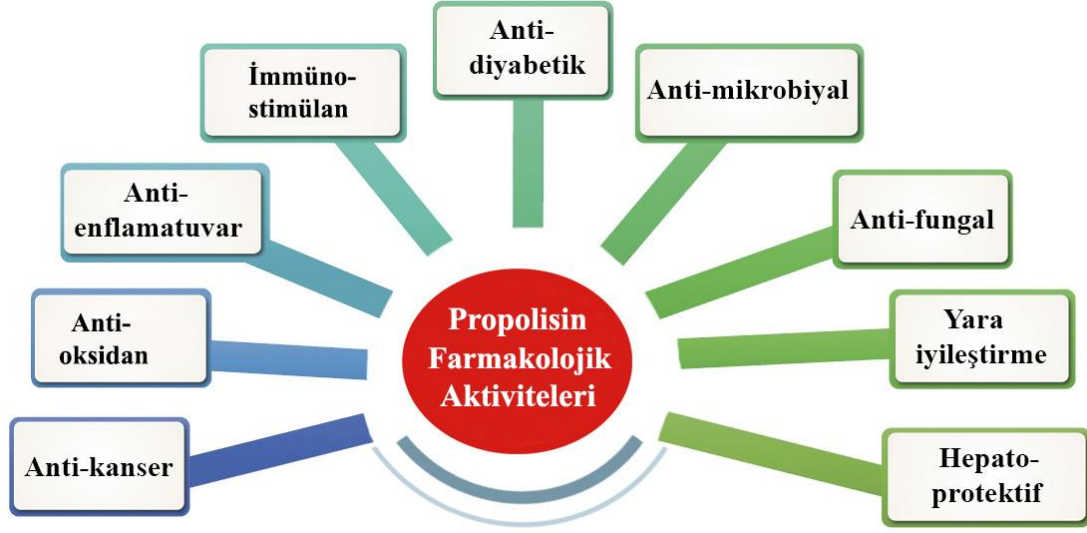
Tablo 2.4: Propolis ekstraksiyonunda kullanılan çeşitli çözücüler ve çözdükleri bileşikler.

Su	Metanol		Etanol
Antosiyaninler, Taninler, Saponinler, Terpenoidler, Polipeptidler, Lektinler, Nişasta	Totarol, Laktonlar, Fenonlar, Kuasinoidler, Flavonlar, Poliipeptidler, Lektinler, Ksantoksilin, Antosiyaninler, Taninler, Terpenoidler, Saponinler		Poliasetilenler, Flavonoller, Steroller, Alkaloidler, Polifenoller, Taninler, Terpenoidler
Diklorometan	Kloroform	Eter	Aseton
Terpenoidler, Taninler, Poliasetilenler, Flavonoller, Steroller, Alkaloidler, Polifenoller	Flavonoidler, Terpenoidler	Kumarinler, Yağ asitleri, Alkaloidler, Terpenoidler	Flavonoller

Sosnowski (1983) metanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, 2-butanol, tert-butanol, dietileter, 1,2-propilen glikol, dimetil sülfoksit, etilen glikol, benzil benzoat, polietilen glikol, aseton ve glasiyal asetik asit gibi çeşitli organik çözücüler kullanarak sıvı propolis ekstraktları hazırlamıştır. Bazı çalışmalarda esansiyel yağlar da propolis ekstraksiyonu için kullanılmıştır (Galeotti ve diğ., 2018; Keskin, 2020). Ultrasonik ve mikrodalga destekli propolis ekstraksiyon tekniğinin geleneksel yöntemden daha verimli olduğu rapor edilmiştir (Trusheva ve diğ., 2007; Pellati ve diğ., 2013).

2.1.6. Propolisin Biyolojik Aktiviteleri ve Sağlık Üzerine Etkileri

Propolisin 12. yüzyıldan beri ağız ve boğaz enfeksiyonlarında, diş çürüğünde tedavi amaçlı kullanıldığı bilinmektedir. Propolis 1600'lü yıllarda Londra'da ilaç olarak belgelenmiştir ve ilk aşamalarda derideki yaraların tedavi edilmesinde kullanılmıştır (Walgrave ve diğ., 2005). Günümüzde propolis ile ilgili yapılan çalışmalarda daha çok araştırılan ve ilgi gören farmakolojik aktiviteler Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2: Günümüzde propolisin daha çok araştırılan ve ilgi gören farmakolojik aktiviteleri.

Propolis örneklerinin coğrafi ya da bitkisel kaynağının, kimyasal içeriğinin ve biyolojik aktivitelerinin tespit edilmesi propolis içeren yeni ürünlerin ve ilaçların geliştirilmesi için önemlidir (Silva-Carvalho ve diğ., 2015). Kujumgiev ve diğ. (1999) propolisin aktivitesinin yapısındaki bileşiklerin karışımına bağlı olduğunu ve herhangi bir bileşiğin etkisinin, ekstrenin bütün aktivitesinden daha büyük olmadığını öne sürmüştür. Propolis ekstraktlarındaki bileşiklerin izole edilmesinin, daha güçlü etkinliğe sahip yapısal bileşenin tespit edilmesini sağlayacağı yönünde görüşler de vardır (Usia ve diğ., 2002; Silici ve Kutluca, 2005; Sforcin, 2016). Propolisin içerdiği bazı bileşikler hücre yüzeyinde yer alan spesifik reseptörlerine bağlanarak hücre içi birçok metabolik yolu tetikleyebileceği gibi, diğer bazı bileşenleri de hücre membranlarından geçerek doğrudan biyolojik aktivite gösterebilir (Bufalo ve Sforcin, 2015; Cigut ve diğ., 2011).

Güncel çalışmalar, immünomodülatör özelliklere sahip propolisi immün bozuklukların tedavisinde alternatif bir ajan olarak önermektedir. Propolis ve içerdiği bazı fenolik bileşikler (galangin ve pinosembrin) nötrofillerin kemotaktik aktivitelerini stimüle edebilir ve fagositik aktiviteyi artırdığı için tıpta immünomodülatör ajan olarak kullanılabilir (Sampietro ve diğ., 2016). Çölyak hastalarının periferik kanından elde edilmiş mononükleer hücrelerde (PBMC) IL-10 salımını tetikleyen, IFN- γ , iNOS ve NO üretimini inhibe eden propolis, sağlıklı insanların

hücrelerinde NO üretimi üzerine etki göstermemiştir. NFκB ve STAT3 inhibisyonu propolisin iNOS yolağı üzerinde modölatör etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Medjeber ve diğ., 2018).

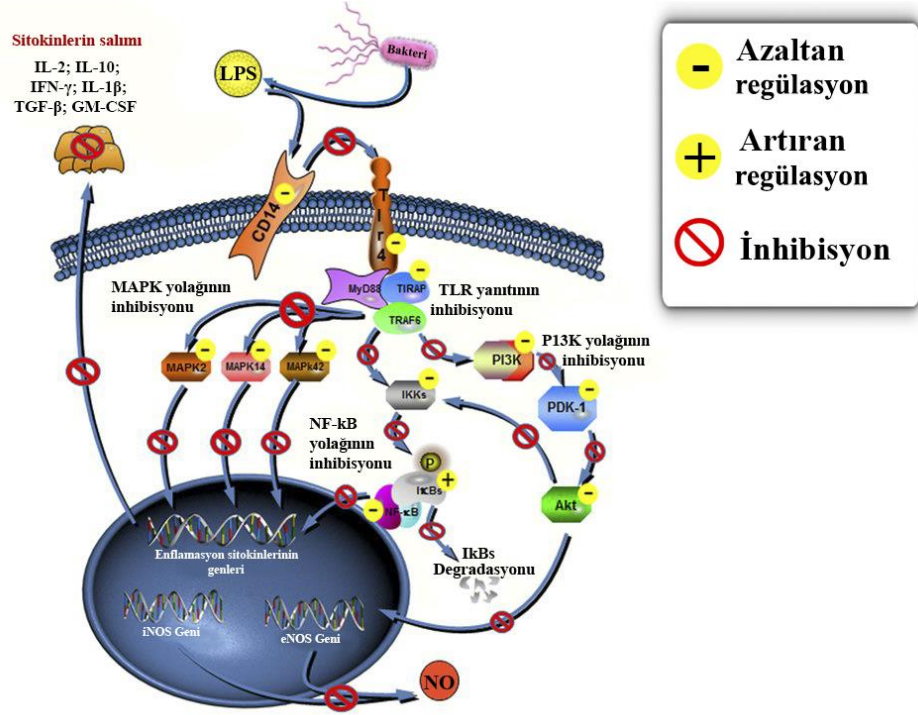
Zaccaria ve diğ. (2017) tarafından, propolisin insandaki transforme keratinosit hücrelerinde (HaCat) miRNA'ların enflamatuvar yanıt ve oksidatif stresle ilişkili anlatımı üzerine yapılan çalışmada kullanılan iki farklı tür örnekten, kahverengi propolisin deney planına dahil olan tüm miRNA'ların (miR-19a-3p; miR-203a-3p; miR-27a-3p; miR-17-3p) anlatım düzeylerini artırdığı, yeşil propolisin ise sadece miR-19a-3p ve miR-27a-3p anlatımı üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu araştırmada kahverengi propolisin TNF-α; NFE2L2 ve GPX2'nin gen anlatım düzeylerini değiştirebilmesi ve yüksek epigenetik aktiviteye sahip olması zengin flavanon ve flavon içeriğı ile ilişkilendirilmiştir.

Propolisin etanolik ekstresinin ve içerdiği fenolik bileşiklerden olan CAPE'nin J774 makrofaj hücrelerinde COX-1 ve COX-2 enzimlerinin aktivitesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, propolisin bu enzimlerin etkinliğini inhibe ettiği ve bu etkinin CAPE ve galangin bileşenleri ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Buna ilaveten, yapılan deneylerde COX-1 ve COX-2 aktivitesinin belirteci olarak ölçülen, PGE₂ üretiminin galanginden çok CAPE tarafından baskılandığı kanıtlanmıştır (Rossi ve diğ., 2002).

Blonska ve diğ. (2004) propolis ve içeriğindeki bazı flavonoidlerin (kuersetin, krizin, galangin, kamferol) LPS ile uyarılmış J774A.1 makrofaj hücrelerinde, IL-1β ve iNOS gen anlatımlarını ve NO üretimini önemli derecede baskıladığını kanıtlamışlardır. İnsan kıkırdağı ve kondrositlerinde kronik enflamatuvar durumunda üretimi artan, IL-1β ile indüklenmiş NO ve GAGs salımını inhibe eden propolis ve CAPE'nin koruyucu etkisinin indometasinden fazla olduğu bildirilmektedir (Cardile ve diğ., 2003). Propolis araşidonik asit ve TPA (12-O-tetradekanoil-forbol-13-asetat) ile indüklenmiş fare kulak ödeminde de anti-enflamatuvar etki göstermiş, NO salımını indirgemıştır (Valenzuela-Barra ve diğ., 2015). Türkiye'de yapılan bir araştırmada yerli propolisten hazırlanmış su ekstresi, farelerde LPS endotoksini ile indüklenmiş göz iltihabı – üveitte NFκB inhibisyonu gerçekleştirerek anti-enflamatuvar aktivite göstermiş ve bu etkinin HIF-1α ve TNF-α düzeylerindeki azalma ile ilgili olduğu öne sürülmüştür (Ertürküner ve diğ., 2016).

LPS ile uyarılmış RAW 264.7 fare makrofajlarına Brezilya'dan toplanmış kırmızı propolis ile hazırlanmış ekstre uygulamasından sonra, hücre süpernatantlarında pro-enflamatuvar

mediyatörler olan IL-1 β , IFN- γ , IL-12, GM-CSF düzeyleri azalmış, TNF- α ve IL-6 sitokinlerinin protein düzeyleri ise artmıştır. Ayrıca kırmızı propolis IL-4, IL-10 ve TGF- β sitokinlerinin düzeyini azaltmıştır. Propolis LPS ile transkripsiyonu indüklenmiş, enflamasyon sinyal genleri olan Pdk1, Pak1, Nfkb1, Mtcp1, Gsk3b, Fos ve Elk1'in anlatımını önemli ölçüde indirmiştir ve bu etki NF-kB ve MAPK sinyal yollarının inhibisyonu ile de kanıtlanmıştır (Şekil 2.3) (Bueno-Silva ve diğ., 2015).



Şekil 2.3: Brezilya kaynaklı kırmızı propolis LPS ile uyarılmış makrofajlarda anti-enflamatuvar etkisi (Bueno-Silva ve diğ., 2015).

Conti ve diğ. (2015) üç farklı ülkeden (Brezilya, Meksika ve Küba) propolis örneklerini insan monosit hücrelerine uygulayarak, bazı örneklerin pro-enflamatuvar sitokin olan TNF- α 'nın üretimini baskılayarak anti-enflamatuvar sitokin IL-10'un üretimini indüklediğini, bazılarının ise tam tersi yönde etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Örneklerin farklı içeriğe sahip olması veya diğer hücrel mediyatörlerin devreye girmesi propolisin hem anti-enflamatuvar, hem de pro-enflamatuvar etki gösterebilmesinin nedeni olarak öngörülmektedir. Yuan ve diğ. (2018) ise Brezilya propolisinin insan peridontal ligament hücrelerinde IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin salınımını inhibe ettiğini, TNF- α anlatımını ise etkilemediğini göstermişlerdir. Kuersetin, krizin

ve pinosembrin bakımından zengin Fas propolisi ile yapılan başka bir çalışmanın deneysel sonuçları da bu araştırmaları desteklemektedir (Touzani ve diğ., 2019).

Orsolic ve Basic (2003), propolisin farelerde makrofaj aktivasyonunu gerçekleştirerek lenfosit aktifleştirici faktörün (LAF) salımını tetiklediğini ve tümör hücrelerinin *in vitro* ölümüne neden olduğunu, bu nedenle nonspesifik anti-kanser özellik sergilediğini rapor etmişlerdir. HL-60 miyeloid kanser hücre hattında kaspaz-3 aktivitesini yükselterek apoptozu artıran propolisin anti-kanser aktivitesi tespit edilmiştir (Ucar ve diğ., 2016).

Diyabetik fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, propolis, enflamasyonu, anormal lipid düzeylerini, oksidatif stresi ve ayrılmış lenfosit proliferasyonunu ve migrasyonunu zayıflatmış, IL-2, IL-4 ve IL-7 sitokinlerinin salımını azaltmış, B ve T hücrelerinin kemotaktik etkinliğini ise artırmıştır (Al Gamdi ve diğ., 2015).

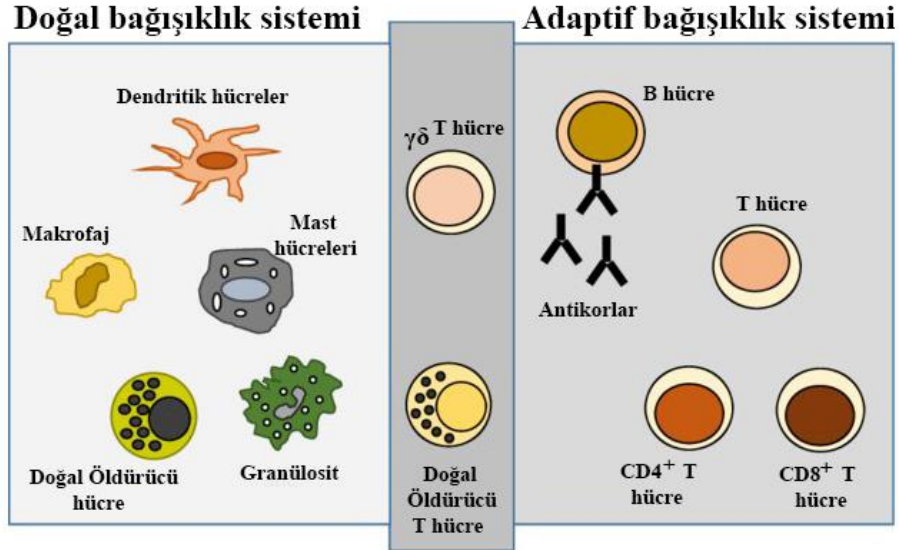
Izuta ve diğ. (2009) Çin kaynaklı kırmızı propolis ile onun içeriğinde yer alan CAPE'nin insan umbilikal ven endotel hücrelerinde (HUVEC) vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile indüklenmiş anjiyogenez üzerine baskılayıcı etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Anti-aterosklerotik, anti-hemostatik, anti-hipertansif, anti-anjiyogenez etkileri, miyokardiyal ve endotelial protektif özellikleri propolisin kardiyovasküler terapötik potansiyeline işaret etmektedir (Silva ve diğ., 2021).

Lipid peroksidasyonunu, hemolizi ve biyofilm oluşumunu inhibe edebilmesi propolisin yara iyileştirme etkisini öne çıkarmaktadır. Yara iyileşmesi çok sayıda mekanizmanın iş görmesine bağlı olduğu için, propolis ve onun içerdiği bileşiklerin anti-oksidan, anti-mikrobiyal, anti-enflamatuvar, anti-diyabetik gibi aktiviteleri “arı tutkalı”nı yara iyileşmesinde önemli kılmaktadır (Oryan ve diğ., 2018).

Yapılan çalışmalarda propolis ve içerdiği bileşiklerin anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE2) ve transmembran proteaz serin proteaz 2 (TMPRSS2) enzimleri üzerine inhibitör etkileri kanıtlandığı için, propolis, konak organizmalara girişte bu enzimlere güçlü bir şekilde bağlanan SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı da potansiyel terapötik bir ilaç olarak önerilmiştir. Ayrıca, CAPE'nin, akciğer fibrozuna neden olan PAK1'in (patojenik kinaz) aktivasyonunu gerçekleştiren RAC proteinini inaktive ettiği daha önceden rapor edildiği için, içeriğinde yüksek miktarda bu bileşiği bulundurabilen propolisin COVID-19 hastalığının tedavisinde etkili olabileceği öngörülmektedir (Berretta ve diğ., 2020).

2.2. İMMÜN SİSTEM, DOĞAL VE KAZANILMIŞ BAĞIŞIKLIK

Klasik tanımına göre immün sistem, bazı proteinleri, immün hücreleri ve onların ürettikleri sitokinler, kemokinler, antikorlar ve büyüme faktörleri gibi humoral faktörleri içermektedir. Humoral ve hücresel faktörleri kendinde birleştiren immün sistem konak organizmayı dış patojenlere karşı korumakla yükümlüdür. Ancak immün sistemin hücreleri bunun da ötesinde doku homeostazı ve onarımı gibi diğer mekanizmalarda da görev alabilirler (Sattler, 2017). Geleneksel olarak immünite (bağışıklık) hem farklı hem ortak hücre tiplerinin rol aldığı 2 alt grupta ele alınır: doğuştan gelen (doğal) immünite ve sonradan kazanılmış (adaptif) immünite (Şekil 2.4) (Sharpe ve Mount, 2015; Kaur ve Secord, 2019).



Şekil 2.4: Doğal ve adaptif bağışıklık sistemlerinde yer alan hücre tipleri (Sharpe ve Mount, 2015).

Organizmanın dış patojenlerin, toksinlerin ve alerjenlerin kendi dokusundan farklılığını tespit etmesi ve onlara karşı immün sistem mekanizmalarını aktive etmesi immün yanıt olarak tanımlanabilir. Kendi doku parçalarının dış işgalci patojenlerden ayırt edilmesi T hücreleri sayesinde mümkün olmaktadır. Tam immün yanıt lökositlerin alt kümelerinin iştirakini içermektedir. Çeşitli lökosit alt türleri, morfolojik olarak geleneksel histolojik boyamalar ve hücre membranlarındaki antijenlerin glikoprotein farklılaşmasının analizi ile birbirinden ayırt edilebilir. Antijenlerin bu tür farklılığı onların spesifik monoklonal antikorlara bağlanabilmesini temin etmektedir. Günümüzde farklılaşma kümesi (CD – “Cluster Differentiation”) ile isimlendirilmiş 350’den fazla antijen tipi bilinmektedir (Chaplin, 2010).

Doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarının üyeleri makrofajlar, mast hücreleri, nötrofiller, eozinofiller, dendritik hücreler ve doğal öldürücü hücrelerdir. Doğal bağışıklık sistemi genel olarak 3 tür immün yanıt stratejisi izleyebilir. Birinci strateji, mikroplar tarafından salınan moleküllere karşı üretilen TLR'ler (Toll-benzeri reseptörler), CLR'ler (C-türü lektin reseptörleri), NOD-benzeri, RIG-I-benzeri ve AIM2-benzeri reseptörler gibi kalıp tanıma reseptörleri ile ilişkilidir. Kalıp tanıma reseptörleri mikroplar tarafından üretilen yüksek oranda korunmuş patojen-ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ları) tanır ve hücrenin kendi yapı taşlarından ayırt etme olanağı sağlar. Korunmuş PAMP'lara örnek olarak endotoksin LPS, viral menşeli çift zincirli RNA, peptidoglikanlar ve metillenmemiş mikrobiyal DNA'lar verilebilir (Janeway, 1989; Brubaker ve diğ., 2015).

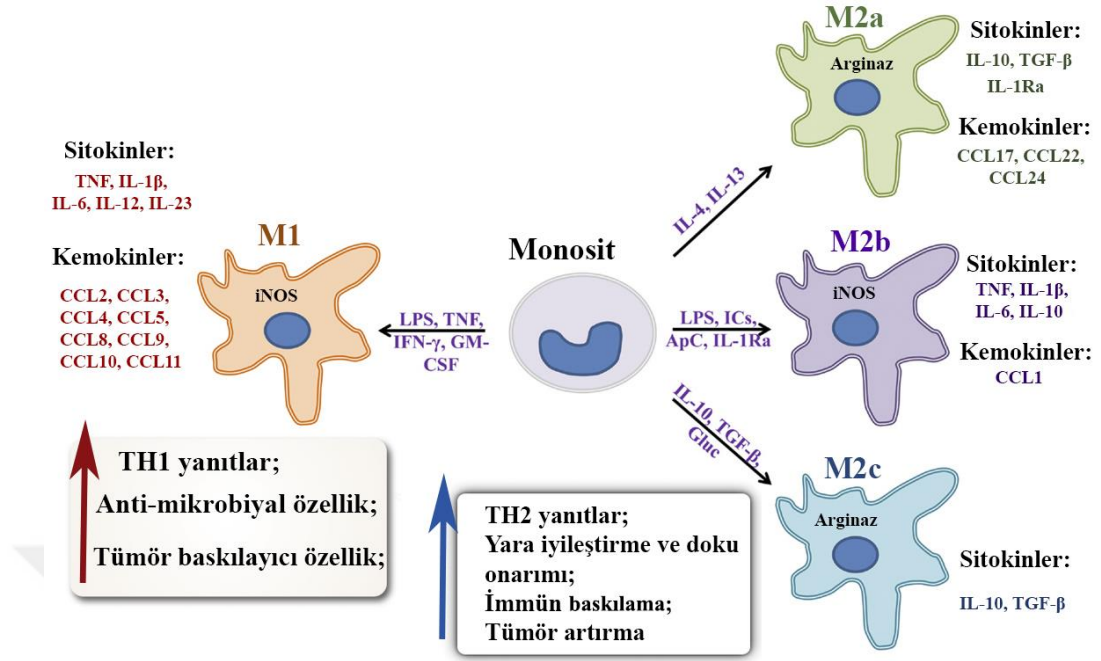
İkinci strateji hasarla ilişkili moleküler kalıpların tanınmasıdır ve bu mekanizma enflamasyon ve enfeksiyonun metabolik sonucunu ifade etmektedir. Hasar ilişkili kalıplar ısı şoku proteinleri, ürik asit, endojen alarminler ve diğer proteinleri içerir (Bianchi, 2007).

Üçüncü strateji, enfeksiyon olmadığı durumlarda, sağlıklı hücrelerin ürettiği moleküllerin tespit edilmesi ile ilişkilidir. Bu moleküllerin belirteç olarak tespit edilmesi, konak organizmanın kendi dokusuna karşı doğal bağışıklık sisteminin aktivasyonunu inhibe etmesine olanak sağlar (Joncker ve Raulet, 2008).

Sonradan kazanılmış bağışıklık veya adaptif immünite, T ve B lenfositleri aracılığıyla daha komplike bir immün yanıt sergilemektedir ve yüksek spesifik antijen tanıma reseptörleri olan TCR'ler (T hücre reseptörleri) ve BCR'ler (B hücre reseptörleri) ile donanmıştır (Yang ve diğ., 2020b).

2.2.1. Makrofajlar

Makrofajlar isimlerini hücresel atıkları yutma ve sindirme özelliklerinden alırlar ve çoğunlukla monositlere dönüşen kemik iliği prekürsör (öncül) hücrelerinden türerler. Makrofaj terimi soy ve fonksiyon açısından farklı olabilen heterojen hücre gruplarını ifade etmektedir. Monositler kemik iliğinde genelde 24 saatten az sürede kalırlar ve daha sonra kana geçerler. Sağlıklı insanlarda monositlerin yarı ömrü 70 saatten kısadır. Kılcal damarlardan bağ dokusuna geçen monositler makrofajlara dönüşürler (Şekil 2.5) (Tauber, 2003; Yona ve diğ., 2013; Arango Duque ve Descoteaux, 2014; Varol ve diğ., 2015).



Şekil 2.5: Monositlerin fenotipleri farklı makrofajlara dönüşmesi – makrofaj polarizasyonu (Arango Duque ve Descoteaux, 2014).

Doğal bağışıklık sisteminin parçası olan makrofajlar, önemli efektör hücrelerdir ve patojenlere karşı konak hücrenin savunmasına dolaylı olarak katkı sağlarlar. Aynı zamanda doku onarımı, adaptif immün sistemin regülasyonu, immün hücrelerin göç zamanının kontrolü gibi görevler de üstlenirler. Makrofajlar patojenleri veya doku hasarlarını tespit edebilmek için çok sayıda kalıp tanıma reseptörleri (Toll-benzeri ve NOD-benzeri reseptörler gibi) salgırlar (Franken ve diğ., 2016; Fritz ve diğ., 2006; Palm ve Medzhitov, 2009; Friedl ve diğ., 2002).

Makrofajlar immün sensör görevlerini daha iyi şekilde yapabilmek için, dokuda tehlike sinyallerini daha etkili şekilde hissedebilecekleri konumda yerleşmişlerdir. Makrofajların demir metabolizması, hasar görmüş eritrositlerin fagositozu veya degradasyonu gibi mekanizmalarda da yer aldığı bilinmektedir (Gordon ve diğ., 1986; Davies ve Jenkins., 2013; Kohyama ve diğ., 2009).

Makrofajların M1 ve M2 polarizasyon aşamasında sınıflandırılmasının nedeni, fonksiyonları ve hücresel mekanizmalara etkileriyle ilişkilidir. M1 polarizasyon bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı makrofajların yanıtını içermektedir ve M1-polarize olmuş makrofajlar pro-enflamatuvar görevi üstlenirler. Bu mekanizmada IL-1 β , IL-6; IL-12; TNF- α gibi sitokinler, CCR7 kemokin reseptörü, CD80 ve CD86 kostimülatör belirteçler, NOS2 ve indolamin-pirrol-

2,3-dioksijenaz gibi enzimler ile ilişkili genlerin anlatımında artış olduğu (“up-regüle oldukları”) kanıtlanmıştır. Bakteriyel bileşiklerin (lipopeptidler, lipopolisakkaritler, flagellin) TLR'lere bağlanması makrofajların M1-polarizasyonunu indükler. M2-polarize makrofajların ise daha çok doku onarımı ve yara iyileştirme ile ilişkili oldukları, IL-4; IL-10; IL-13; TGF- β gibi anti-enflamatuvar sitokinleri salgıladıkları rapor edilmiştir. Makrofajların immün yanıtla ilişkili hücresel mekanizmalarda sitokinlerden başka, kemokinler, prostaglandinler ve lökotrienler salgılayabildiği de bilinmektedir (Benoit ve diğ., 2008; Beutler, 2009; Lu ve diğ., 2008; Hayashi ve diğ., 2001; Italiani ve Boraschi, 2014).

M1-polarize makrofajlar yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif nitrojen türleri (RNS) ve iNOS üretir ve salgılayabilir, arjininin NO ve sitruline metabolize edilmesini sağlar. M1-polarize makrofajlardan salgılanan kemokinler doğal öldürücü hücreleri ve Th1 hücrelerini devreye sokar. Monositlerin IL-4 ve IL-13 ile tetiklenmesi onların M2 fenotipine polarizasyonunu sağlar (Cole ve diğ., 1998; Biswas ve Mantovani, 2010).

2.2.2. Sitokinler, Tanımı ve Sınıflandırılması

Sitokinler 5-30 kDa ağırlığında peptidler veya glikoproteinler olup isimlerini yunanca “cyto” (hücre) ve “kinos” (hareket) sözlerinden almışlardır. Bu proteinler, reseptörler üzerinden büyümeyi ve olgunlaşmayı sağlayan ve diğer bazı önemli hücresel mekanizmaları düzenleyen hücreler tarafından üretilir. Genellikle makrofajlar tarafından salgılandığı bilinen sitokinler, aktifleşmiş lenfositler, endotelial hücreler ve fibroblastlar tarafından da üretilebilir. Sitokinlerin genel sınıflandırılması Tablo 2.5'te verilmiştir (Ramani ve diğ., 2015).

Aynı zamanda, lemfokinler, kemokinler, monokinler, interlökinler, interferonlar, büyüme faktörleri, koloni indükleyici faktörler olarak isimlendirilen sitokinler pikomolar gibi düşük konsantrasyonlarda salgılanırlar ve yaşam süreleri çok kısadır. Sitokinler reseptörlere bağlanarak hedef hücrelerde bazı genlerin anlatımına neden olur. Çeşitli hücreler üzerinde farklı etkiler göstererek pleiotropi karakteri sergileyen sitokinler aynı zamanda sinerjik etki özelliğini de yansıtabilirler (Beutler, 1999).

Tablo 2.5: Sitokinlerin sınıflandırılması (Ramani ve diğ., 2015).

Yapılarına göre	Fonksiyonlarına göre	Reseptörlerine göre
4 alfa sarmal yapılı (IL-2, IFN, IL-10 alt aileleri)	İmmün yanıtı düzenleyen Tip I immünomodülatör sitokinler (örneğin: IFN- γ , TNF- α)	İmmünoglobulin süper ailesi;
IL-1 ailesi;		Hematopoetik reseptör ailesi (I sınıf);
IL-17 ailesi;	Antikor üretimini düzenleyen Tip II immünomodülatör sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β)	IFN süper ailesi (II sınıf);
Sistein bağlı sitokinler (TGF süper ailesi)		TNF reseptör ailesi;
		Kemokin reseptör ailesi

IL-1 ailesi 11 çözünür molekül ve 10 reseptörden oluşmaktadır. Sitokinlerin bu ailesi IL-1'in konsensüs dizisine, sinyal reseptörleri zincirine dayalı 3 altgrupta sınıflandırılabilir. IL-1 ailesi, salgılanan agonistik aktiviteli (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ), reseptör antagonisti (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) ve anti-enflamatuvar sitokin (IL-37) moleküllerini içerir (Dinarello, 2018; Garlanda ve diğ., 2013).

2.2.3. NO, iNOS ve İmmün Yanıtla İlişkisi

Nitrik oksit (NO) damar genişletme, nöronal iletişim ve trombosit agregasyonunun inhibisyonu gibi önemli mekanizmalarda yer aldığı gibi, immün ve enflamasyon yanıtlarda da üretilebilir ve bu mekanizmadaki fonksiyonu karmaşıktır. Doğuştan gelen bağışıklıkta bulaşıcı organizmalara karşı toksik ajan görevini üstlenen NO, aynı zamanda konak immün hücrelerinin fonksiyonlarını veya ölümünü indükleyebilir. Hücrelerde inhibisyon ve apoptotik etkilerinden dolayı anti-enflamatuvar veya immünbaskılayıcı aktivite gösteren NO, astım sırasındaki enflamasyonda yüksek miktarda üretilir ve konağın diğer dokularına karşı toksik reaksiyonları indükleyerek pro-enflamatuvar aktive de sergileyebilir (Coleman, 2001).

NO çok işlevli, kısa ömürlü, 30 Da moleküler ağırlığa sahip serbest bir radikaldir. Sinyal molekülü olarak nitrik oksit, hormon salgılanması, enflamasyon, nöronal iletişim, damar genişlemesi, vasküler geçirgenlik, yara iyileşmesi ve başka birçok önemli mekanizmayı

düzenleyebilmektedir. İki atomlu bileşik olan nitrik oksitin *in vivo* düzeyi nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından devamlı olarak modüle edilmektedir (Alimoradi ve diğ., 2019).

Nitrik oksit (NO) insanlarda endojen olarak NOS enzimi vasıtasıyla L-arginin amino asitinden üretilir ve bu klasik yolak olarak bilinmektedir. NOS enziminin 3 izoformu mevcuttur ve her izoformun geni farklı kromozomlarda yerleşmiştir: nöronal Nitrik Oksit Sentaz (nNOS – tip I), indüklenabilir Nitrik Oksit Sentaz (iNOS – tip II), endotelyal Nitrik Oksit Sentaz (eNOS – tip III). Tip I ve Tip III izoformları, cNOS (konstitütif form) olarak sınıflandırılmıştır, devamlı olarak hücrede mevcuttur ve kalsiyumun kalmoduline bağlanması ile aktif hale gelirler. iNOS bazı hücrelerde spesifik sitokin kombinasyonlarının etkisiyle salgılanabilir (Tablo 2.6) (Wink ve Mitchell, 1998; Weitzberg ve diğ., 2010; Moncada ve Higgs, 1993).

Tablo 2.6: Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enziminin üç izoformu, aktivasyonu ve görev aldıkları önemli mekanizmalar.

İzoformlar	İlk keşfedildiği organ (doku, hücre)	Aktivasyon etkeni	Görev aldıkları önemli mekanizmalar
eNOS	Damar endoteli	Kalsiyum ve Kalmodulin	Vasküler tonun düzenlenmesi
nNOS	Beyin		Merkezi ve periferik nöronal fizyoloji
iNOS	Makrofajlar	Enfeksiyon ve enflamasyonla ilişkili olan ajanlar (örneğin, sitokinler, LPS)	Enfeksiyonla mücadele

Makrofajlar veya vasküler kas hücreleri NO üretimi için sitrulinden arjinin rejenere edebilir. LPS tür endotoksinler sitrulin-NO döngüsünü düzenleyen enzim olan arjino-süksinat sentataz enzimini indükleyebilir. Reaktivitesi yüksek bir serbest radikal olarak değerlendirilen NO, üretildikten sonra uzun süre doğal halini koruyamaz, kısa sürede oksitlenebilir (NO+ nitrosonium iyonu), redükte olabilir (NO- nitroksit iyonu) veya çeşitli biyomoleküllerle kompleks oluşturabilir (Bogdan, 2001; Yun ve diğ., 1997).

2.3. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

Günümüzde kullanılan ilaçların %25'i doğal kaynaklardan elde edilen moleküllerden hazırlanmaktadır. Bu ürünler sağlık üzerindeki olumlu etkilerinin yanı sıra, bazı olumsuz

özellikler de sergileyebilirler. İlaç taşınmasında büyük boyutta malzemelerin kullanımı, hedefe yönelik taşınmayı engeller; *in vivo* dayanıksızlık, zayıf biyoyararlanım, az çözünme ve vücutta düşük absorpsiyon değerleri gibi olumsuzluklar içerebilir. Bu nedenle günümüzde mikro- ve nano- boyutta yeni ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Martinho ve diğ., 2011; Jahangirian ve diğ., 2017).

Mikro ve nano boyutta hazırlanan formülasyonlar bazı istisnalar dışında, partiküllerin çapına göre isimlendirilmiştir. Mikroteknoloji yöntemleri ile hazırlanan partiküllerin boyutu 0.1–100 μm (10^2 – 10^5 nm), nanoteknolojik yaklaşımla oluşturulan partiküllerin boyutu ise 1-1000 nm arasında değişir (Johannesson ve diğ., 2016; Allahverdiyev ve diğ., 2011).

Günümüzde mikro ve nanopartiküller klinikte farklı şekillerde uygulama alanı bulmaktadır: ağızdan (klinik görüntüleme uygulamalarında), lokal (peptidlerin ve küçük moleküllerin artırılmış çeşit ve sayıda taşınmasında) veya sistemik-intravenöz (kanser tedavisinde). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) bu taşıyıcı sistemlerin tüm uygulama şekillerini onaylamıştır (Cortajarena ve diğ., 2014; Hua, 2015; Min ve diğ., 2015).

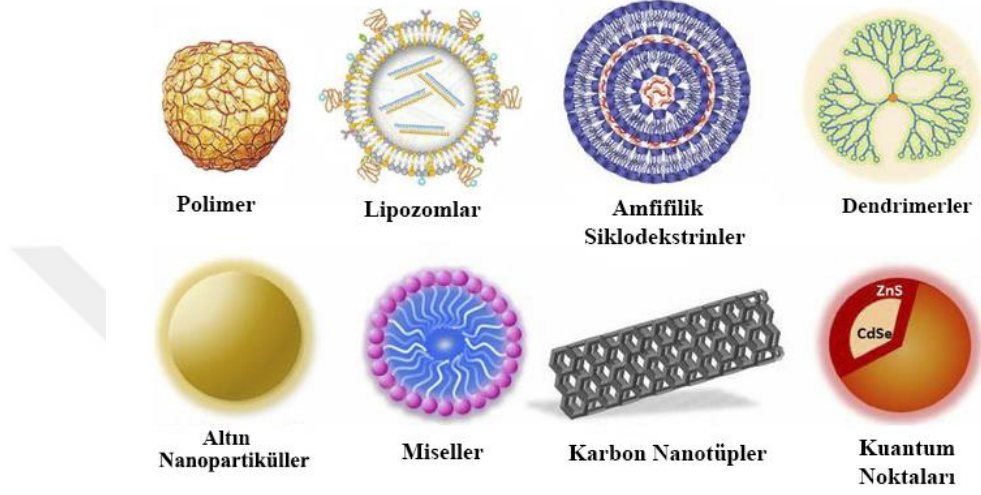
2.3.1. Nano Temelli İlaç Taşıyıcı Sistemler

Terapötik ve tanı amaçlı kullanılan, nankapsül ve nanoküreleri içeren nanopartiküller ailesi genellikle iki grupta sınıflandırılır: 1. İnorganik (altın, demir oksit, silika vb.); 2. Organik nanopartiküller (polimerik nanopartiküller, lipozomlar vb.). İnorganik nanopartiküller klinikte tümörlerin termal ablasyonunda, intraoperatif sentinel lenf nodu görüntülemeye; organik nanopartiküller ise aşı geliştirmede, uzun ömürlü depo taşıyıcı sistemlerde, deriden topik ajanların sistemik taşınması gibi uygulamalarda kullanılmaktadır (Anselmo ve Mitragorti, 2015; McCarthy ve Weissleder, 2008).

Nanopartiküllerin uzun süre kan dolaşımında kalması ve belirli dozlarla kontrollü şekilde ilaç salımını sağlaması en önemli avantajlarından, dolayısıyla olumsuz plazma dalgalanmalarına yol açma olasılıkları düşüktür. Ayrıca nanopartiküller, formülasyondaki ilaçların gastrointestinal bölgede korunmasını ve suda çözünebilen etken maddelerin hedefe güvenli şekilde taşınmasını sağlarlar. Nano boyuta sahip olmaları nedeniyle nanopartiküller dokuya kolayca nüfuz ederler ve hücrelerin ilaç moleküllerini içine almasını kolaylaştırırlar (De Villiers ve diğ., 2008; Patra ve diğ., 2018).

2.3.2. Farklı Nanopartikül Modelleri

Nanopartiküller boyutlarına, yapılarındaki içeriğe, şekillerine ve fonksiyonlarına göre çeşitlilik gösterebilir. Çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanopartikül türleri Şekil 2.6’da gösterilmiştir (Mc Carthy ve diğ., 2015).



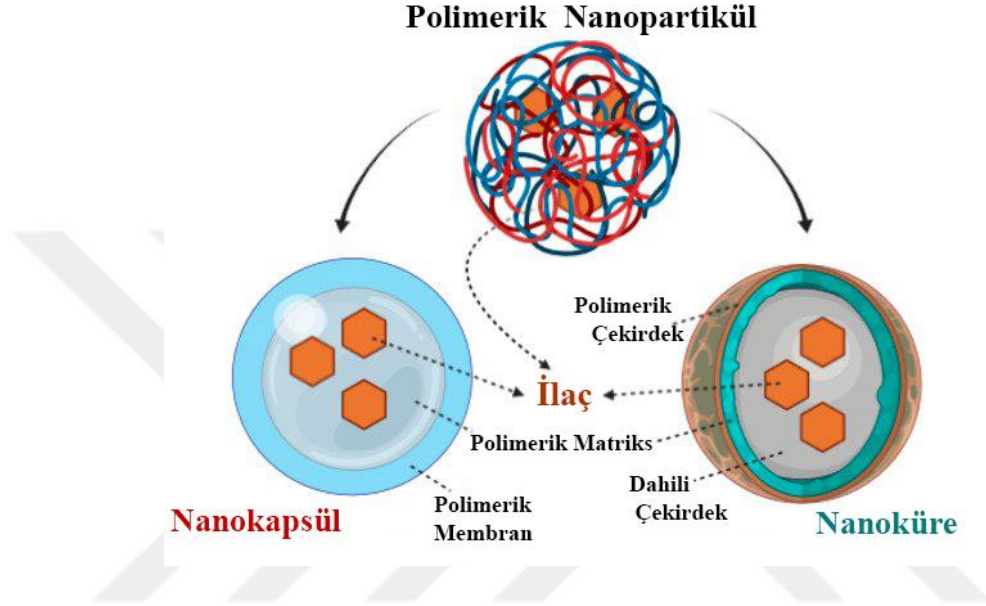
Şekil 2.6: Çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanopartikül türleri (Mc Carthy ve diğ., 2015).

Klinikte biyosensör, biyogörüntüleme, hedeflenmiş ilaç taşıma ve hipertermi gibi uygulamalarda kullanım alanı bulan nano boyutlu metal taşıyıcı sistemlere örnek olarak altın, gümüş, demir, bakır nanopartiküller gösterilebilir. Geniş çapta araştırılmış demir oksit nanopartikülleri genellikle manyetit (Fe_3O_4) ve maghemitten ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) oluşmaktadır ve süperparamanyetik özellikleri ile önem arz etmektedirler (Mc Namara ve Tofail, 2015; Wang ve Wang, 2014).

Kuantum noktaları (“QD-Quantum Dots”) boyutları 2-10 nm arasında değişen semikondüktör nanokristallerdir ve absorbans, fotoluminesans gibi optik karakterlere sahiptirler. İnfrared ölçeğine yakın (< 650 nm) emisyon özelliklerine sahip bu nanopartiküller biyomedikal görüntülemede kullanım alanı bulmaktadır (Volkov, 2015).

Polimerik nanopartiküller küçük boyutları, ilaç moleküllerinin kontrollü salımı, dış etkenlerden korunması ve diğer özelliklerinden dolayı günümüzde araştırmacıların yoğun ilgisini çekmektedir. Bu tür nanopartiküllerin içerdiği nanokürelerde ilaç molekülü sürekli polimer

ağının içerisinde tutulabilir veya üzerine adsorbe edilebilir. Diğer bir alt grup olan nanokapsüllerde ise etkin madde yapıdaki yağlı çekirdekte çözünmüş şekilde bulunur ve kenarlardan polimer iskelesi ile örtülür. Polimer iskele çekirdek kısımdaki etkin molekülün kontrollü salımını sağlar (Şekil 2.7) (Owens ve Peppas, 2006; Soppimath ve diğ., 2001; Zielinska ve diğ., 2020).



Şekil 2.7: İlaç molekülleri ile yüklenmiş nanokapsüllerin ve nanokürelerin şematik yapısı (Zielinska ve diğ., 2020).

Lipozomlar ilk nanopartikül platformu olarak bilinmektedir ve 1960 yılında Alec Bangham tarafından hücre membranı modellerinde keşfedilmiştir. Lipozom nanopartiküller 4 grupta incelenir: 1. Geleneksel tip lipozomlar; 2. Polietilenglikollenmiş (PEGylated) lipozomlar; 3. Ligand hedefli lipozomlar; 4. Teranostik lipozomlar. Biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir oldukları kanıtlanmış bu nanopartiküller, boyutları 50-450 nm arasında değişebilen, fosfolipit ve steroidlerden oluşan sferik şekilli veziküllerdir. Lipozomların terapötik bileşikleri stabil hale getirdikleri, biyolojik dağılımlarını iyileştirdikleri, hem hidrofilik, hem de hidrofobik ilaçlarla birlikte kullanılabildikleri rapor edilmiştir (Bozzuto ve Molinari, 2015; Bangham, 1993; Sercombe ve diğ., 2015).

Doğal biyopolimerler olarak isimlendirilen protein ve polisakkarit nanopartiküller bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar gibi doğal kaynaklardan elde edilir. Protein temelli nanopartiküllerin en önemli avantajları metabolize edilebilmeleri, ayrıştırılabilir olmaları,

spesifik ilaçlara ve hedeflenen ligandlara kolayca bağlanabilmeleridir. Polisakkarit nanopartiküller ise yüksek sıcaklıkta bozulmaları nedeniyle nanoteknolojik uygulamalarda sorun oluşturabilmektedir (Pertici, 2017; Poole-Warren ve Patton, 2016).

Amfifilik blok kopolimerlerinden oluşan polimerik misellerin boyutları 100 nm'den küçüktür ve sulu solüsyonda çekirdek dış kaplama iskelesini oluşturmaktadır. Bu nanopartiküllerin özelliği, hidrofobik yapılarında hidrofobik moleküllerin kapsüllenebilmesi, hidrofilik yapılarının da tüm sistemin suda kolay çözünmesini sağlamasıdır (Miyata ve diğ., 2011; Xu ve diğ., 2013).

Diğer bir nanopartikül türü olan dendrimerler monodispers, 3-boyutlu ve yüksek çatallı yapılardır. Küresel şekilli olmaları nedeniyle dendrimerlerin yüzeyleri etkin fonksiyon yeteneği taşımaktadır. Bu tür nanopartiküller fonksiyonlarına göre glikodendrimerler, peptid, kiral, sıvı kristalin, çekirdek yapılı ve diğer olmak üzere farklı gruplarda sınıflandırılabilir (Noriega-Luna ve diğ., 2014).

2.3.3. Polimerik Nanoformülasyonların Hazırlanmasında Kullanılan Yöntemler

Polimerik nanopartiküllerin üretimi için, kapsüllenecek etkin ilaç molekülünün karakterine ve uygulanma şekillerine bağlı olarak çeşitli teknikler kullanılabilir. Bu yöntemler genellikle iki sınıfta ele alınır: 1. Önceden oluşturulmuş polimerlerin dağılımı (dispersiyonu); 2. Monomerlerin polimerizasyonu. Çok sayıda nanopartikül hazırlama tekniklerinin ilk aşamasında polimerler organik çözücülerde çözündürülür. Bu solventler bazen toksisite ve çevre açısından risk oluşturabilir ve son üründen uzaklaştırılmaları gerekebilir. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan bazı yöntemler Tablo 2.7'de verilmiştir (Amgoth ve diğ., 2019; Jawahar ve Meyyanathan, 2012; Reis ve diğ., 2006).

Tablo 2.7: Polimerik nanokapsüllerin ve nanokürelerin üretiminde kullanılan bazı yöntemler.

Polimerik Nanopartiküller	Üretim Yöntemleri
Nanoküreler	Çözücü Buharlaştırma Emülsiyon / Çözücü Difüzyon Nanoçöktürme Emülsiyon / Ters Tuzla Çöktürme
Nanokapsüller	Nanoçöktürme

Polimerik nanoformülasyonların üretimi için kullanılan polimerler 3 alt kategoride tanımlanabilir: 1. Doğal polimerler (Sellüloz, Kitosan, Kitin, Jelatin, Kollajen, Albumin, Nişasta vb.); 2. Yarı-sentetik polimerler (PCL, PLA, PLGA vb.); 3. Sentetik polimerler (PEG, PGA vb.).

2.3.4. Polikaprolakton

Polikaprolakton (PCL, “poly-ε-caprolactone”) biyolojik olarak parçalanabilir bir poliesterdir. PCL’nin açık zincir polimerizasyonu ilk kez 1930 yılında başarılmış olup bu polimerizasyon 59-64°C erime noktasına sahip yarı kristal, hidrofobik bir polimer oluşturmaktadır. Homopolimerlerden farklı olarak kopolimerlerin emilim süresi daha azdır. Etilenoksit, polivinilklorür, polietilen glikol, polistiren, diglikolid, dilaktid gibi monomerler kullanılarak PCL’nin daha verimli kopolimerleri oluşturulabilir. Örneğin Poli- ε-kaprolaktonun DL-laktid kopolimeri esnektir ve bozulma süresi polikaprolaktondan çok daha yüksektir. PCL alkolde, dietil eterde çözünmez, asetonda az çözünür, diklorometan, kloroform, benzen, toluen gibi çözücülerde ise oda sıcaklığında çözünür (Sinha ve diğ., 2004).

2.3.5. Kapsüllenmiş Propolis ve Kuersetin Formülasyonlarının Etkinliği

Brezilya’dan toplanmış propolis PCL polimeri ile mikro boyutta (5–10 µm boyutta) kapsüllenmiş ve elde edilen mikropartiküllerin *Streptococcus mutans* (GS5)’e karşı antibakteriyal etkinlikleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar mikropartiküllerin kapsüllenmemiş propolisten 10 kat daha düşük konsantrasyonda aynı etkiyi gösterebildiğini ortaya koymuştur (Duran ve diğ., 2007). Barbosa ve diğ. (2019) Brezilya menşeli propolisi gümüş nanopartiküllerle kapsüllemiş ve elde edilen formülasyonların etkin anti-mikrobiyal aktivitelerini kanıtlamışlardır.

Eskandarinia ve diğ. (2020) polikaprolakton/jelatin (PCL/Gel) kompleksini yapı iskelesi olarak kullanarak, poliüretan ve propolisin etanolik ekstresinden iki katmanlı nanofiberler sentezlemişler ve bu formülasyonları yara iyileştirmede kullanılmak üzere potansiyel antibakteriyal ürün olarak önermişlerdir.

Kırmızı propolisin hidroetanolik ekstresi PLGA polimeri ile nano boyutta kapsüllenmiş ve bu formülasyonun *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinin oluşmasını inhibe eden anti-mikrobiyal aktivitesi rapor edilmiştir (De Melo Silva ve diğ., 2020).

Zhang ve diğ. (2019) küre şekilli zein/kazeinat/alginate sistemi ile kapsüllenmiş propolis nanoformülasyonlarının biyoerişilebilirliğinin (geniş pH değerlerine ve tuzlu konsantrasyonlara tolerans) serbest propolise nazaran %80 daha fazla olduğunu kanıtlamışlardır.

Yapılan başka bir araştırmada, Mısır kaynaklı propolis örnekleri, katı dispersiyon formülasyonunda, PLGA, PF-108 nanopartikülleri ile sistemli şekilde kapsüllenmiş ve bu ilaç taşıyıcı formülasyonun HepG2 ve HCT-116 kanser hücrelerinde serbest propolisten 3 kat daha fazla sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bundan başka propolis-nanopartikül formülasyonlarının HepG2 hücre hattında apoptozu önemli derecede indüklediği ve kanser hücrelerinin sayısını G0/G1, S ve G2/M fazlarında azalttığı belirlenmiştir (Elbaz ve diğ., 2016).

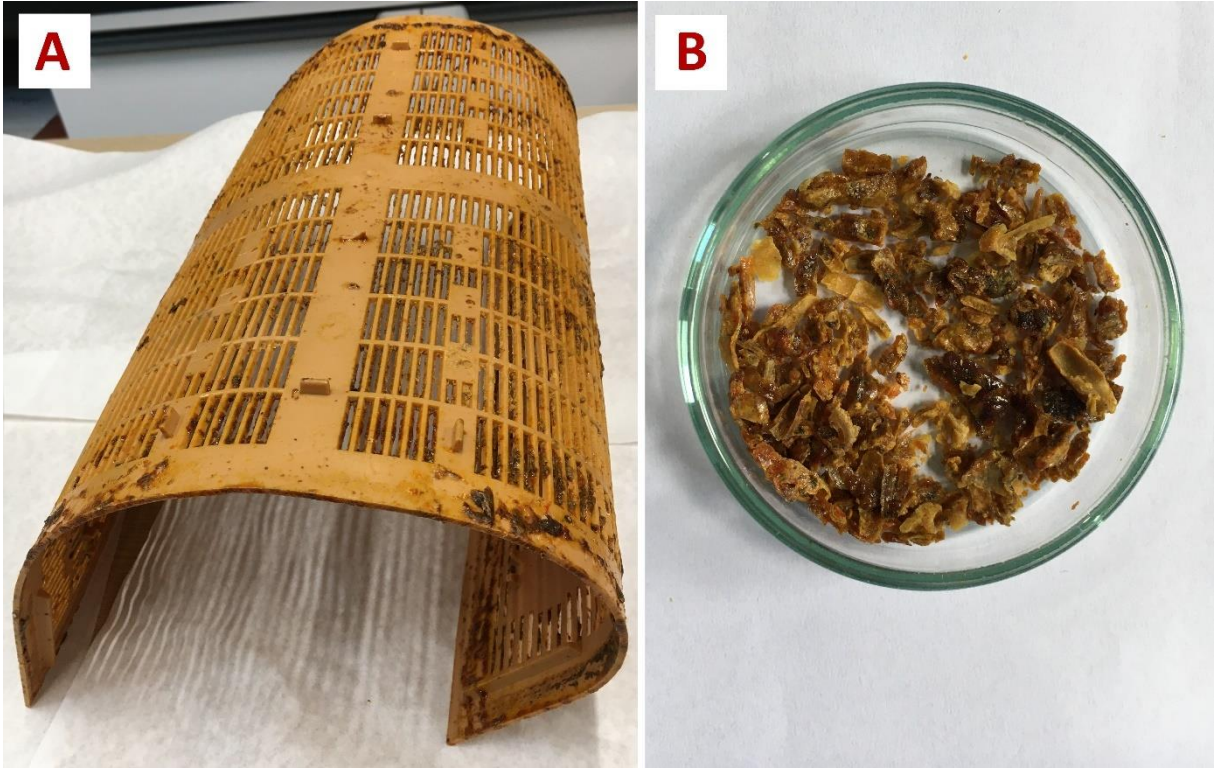
Silika ile kapsüllenmiş kuersetin nanopartikülünün anti-enflamatuvar ve anti-oksidan özelliklerini koruduğu, makrofajlarda IL-1 β , IL-6 ve TNF- α sitokinlerinin düzeyini büyük ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir (Lee ve diğ., 2016a). Altın ve gümüş nanopartiküllerle kapsüllenmiş kuersetinin kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Lee ve Park, 2020).

Tzankova ve diğ., (2017) kitosan/alginate nanopartikülleri ile kapsüllenmiş kuersetinin oksidatif stres kaynaklı karaciğer hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. PROPOLİS

Bu tez çalışmasında kullanılan propolis örneği, Aralık, 2019 tarihinde Kırklareli/Kıyıköy beldesindeki yerel bir arılıktan temin edildi. Bal arısı (*Apis mellifera* L.) kovanlarına yerleştirilen propolis tuzakları kovanlardan alınarak birime ulaştırıldı ve sertleşmiş ham propolis (Şekil 3. 1) tuzaklardan çıkartılarak deneylerde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.



Şekil 3.1: Propolis tuzaklarından (A) çıkartılan ham propolis örneği (B).

3.2. KİMYASALLAR, TAMPONLAR, SOLÜSYONLAR

Deneylerde kullanılan başlıca kimyasallar Tablo 3.1’de, tamponlar ve solüsyonlar ise Tablo 3.2’de verildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan başlıca kimyasallar.

Kuersetin; $\geq$ %95 saflıkta	Santa Kruz; 25 g
Lipopolisakkarit; <i>E.coli</i> (serotip O111:B4)	Sigma Aldrich; 1 mg
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma Aldrich; 100 mg
Polikaprolakton (PCL); Mw ~14.000	Sigma Aldrich; 250 g
Polivinil Alkol (PVA); % 87-90 Hidrolize Edilmiş	Sigma Aldrich; 250 g
RPMI 1640 besiyeri; Glutamin içerir	Biosera; 500 mL
Fetal Bovin Serum (FBS): Standard Forte, South America, Fetal bovine serum with Additive FortiFier	Pan-Biotech; 100 mL
Absolü Etanol ($\geq$ %99.9 saflaştırılmış)	IsoLab, 2.5 l

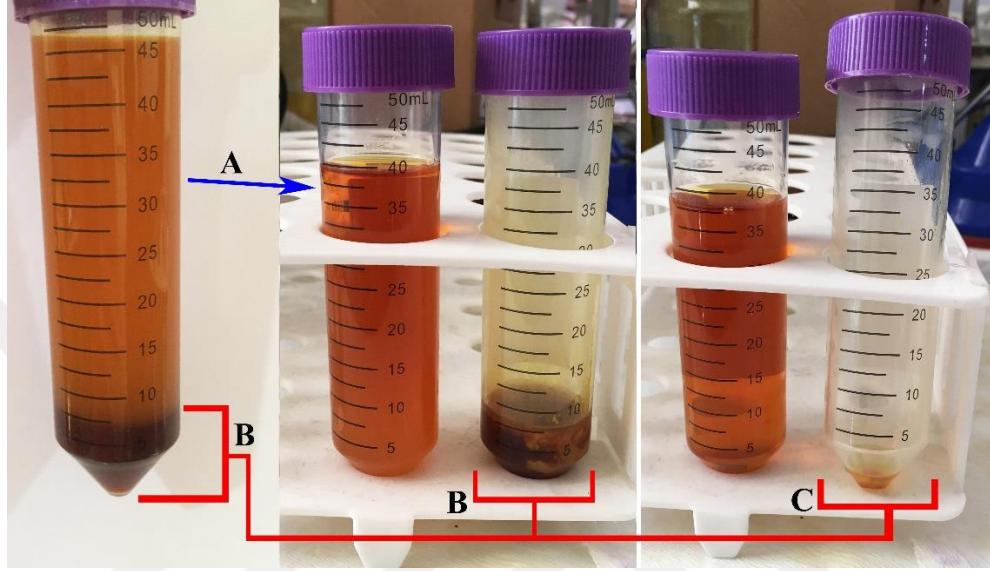
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan başlıca tamponlar ve solüsyonlar.

Tampon/Solüsyonr	Hazırlanışı	Deneylerde Kullanım Amacı
PBS tamponu (pH 7.4.)	NaCl (8 g), KH ₂ PO ₄ (0.2 g), Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O (1.8 g) ve KCl (2 g). 900 mL distile suda çözündürüldü ve son hacim 1 L'ye tamamlandı	Toz şeklinde temin edilen bazı ürünlerin seyreltilmesi.
Tripan mavisi (%10)	Tripan mavisi (Merck) (10 g) suda çözündürülerek son hacmi 100 mL'ye tamamlandı	Hücre sayımı - hücrelerin canlılık tayini
MTT solüsyonu	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide tuzu (10 mg) 1 mL PBS'de çözündürüldü	Sitotoksisite analizleri
Kriyoprotektan solüsyonu	%90 fetal sığır serum (FBS) ve %10 dimetil sülfoksit (DMSO) içerecek şekilde hazırlandı	J774 fare makrofaj hücrelerinin kriyoprezervasyonu
Griess solüsyonu	Sülfanilamid (1 g) ve etilendiamin dihidroklorür (0.1 g) bir miktar distile suda çözündürüldü; 2.5 mL fosforik asit eklendi ve son hacim 100 mL'ye tamamlandı	NO analizi

3.3. PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRESİNİN HAZIRLANMASI

Dondurulmuş ham propolis örneğinden 50 g tartıldı ve 1:4 örnek ağırlığı/çözücü hacmi oranı sağlanarak beherde 200 mL %70 etanol ile karıştırıldı. Karışımın ışıktan etkilenmemesi için beherin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak kapatıldı ve karışım 60°C'de 1.5 saat karıştırıldı. Bu aşamada, beherdeki solüsyonun uçmaması için beherin ağzı kapatıldı. Etrafı ışık geçirmeyecek şekilde kapatılmış beher oda sıcaklığında 72 saat bekletildi. Üç gün oda

sıcaklığında bekletilen propolis/etanol karışımı sonraki işlemlerden önce 1.5 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Vakumlu filtre sisteminden 3 kere geçirilen sıvı faz her aşamada 50 mL'lik deney tüplerine aktararak 5000 rpm'de 7 dakika santrifüjlenerek balmumu çökeltilerden ayrıştırıldı (Şekil 3.2) (Kubiliene ve diğ., 2015).



Şekil 3.2: Propolis etanol ekstresinden balmumu çökeltilerinin santrifüjleme ile uzaklaştırılması: A-Sıvı fazın şeffaflaşması; B-balmumu içeren çökelti; C-Son santrifüj aşamasında balmumu çökeltilerinin azalması.

Vakumlu filtre sisteminin kullanıldığı her aşamada, filtrat kullanılmadan önce ve sonra tartılarak üzerindeki çökeltilerin miktarı not edildi. Sıvı faz etrafı kapatılmış beherlere aktarıldı, beherin ağzı delinmiş parafilm ile kapatıldı ve vakumlu etüvde (40°C) alkolün buharlaşması için bekletildi. Vakumlu etüvden alınan ve distile su ile sulandırılan propolis ekstresi liyofilizasyon işlemleri için 15 mL'ik deney tüplerinde -40°C'de donduruldu. Liyofilizatörde kurutulan örnekler -40°C'de muhafaza edildi.

3.4. PROPOLİS VE KUERSETİN NANOPARTİKÜLLERİNİN HAZIRLANMASI

Propolis ve kuersetin nanopartiküllerinin hazırlanması için ikili emülsiyon (y/s/y) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanıldı (Reis ve diğ., 2006). Bunun için, ilk aşamada her iki ürün için ayrı olarak nanotaşıyıcı sistemlerin üretiminde kullanılacak solüsyonlar (organik ve sulu fazlar) hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan solüsyonlar – organik ve sulu fazlar.

Solüsyon	Hazırlanması
%3 PCL	3 mg polikaprolakton tartıldı ve son hacim 100 mL olacak şekilde diklorometanda çözündürüldü
%1 PVA	1 mg polivinil alkol tartıldı ve son hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözündürüldü; çözünme 600 rpm’de karıştırma ile hızlandırıldı

3.4.1. Propolis ve Kuersetin Nanopartiküllerinin Hazırlanması

Etanolde hazırlanmış propolis ekstresi ve ticari olarak temin edilmiş kuersetin flavonoidinin uygun çözücülerde (Propolis için Alkol; Kuersetin için DMSO) 2 mg/mL konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Hazırlanacak her iki nanopartikül için: Etkin madde çözeltisi manyetik karıştırıcı üzerinde (Heidolph MR3000) organik fazla (diklorometan içerisinde çözünen PCL polimeri) karıştırıldı. İki dakika buzda sonikasyon işleminden sonra her iki karışım ayrı beherlerde PVA (%1) stabilizatörü içeren sulu fazlara enjektörle damlatılarak kapsülleme işlemi gerçekleştirildi. Kapsülleme sonrası manyetik karıştırıcıda 4 saat süreyle organik fazın uçması sağlandı.

Bu aşamadan sonra santrifüj kullanarak 3 basamakta yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama aşamalarında biriken süpernatantlar 50 mL’lik deney tüplerine aktarıldı ve toplam süpernatantlar enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için +4°C’de tutuldu. Pelletde yer alan nanopartiküllerin ZetaSizer ile boyutları ve zeta potansiyelleri ölçüldü.

Nanopartiküller karakterizasyon ölçümlerinden (SEM, XRD, FTIR, UV-VIS) ve hücre uygulamalarından önce kurutuldu. PCL ile kapsüllenmiş propolis ve kuersetin nanopartiküllerinin (sırasıyla Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) kurutulması için liyofilizasyon işlemi gerçekleştirildi. ZetaSizer ile ölçümler sonrasında nanopartiküller -40°C’de donduruldu. Ardından 48 saat -60°C’de yüksek basınç altında (vakumlu alanda) kurumaya bırakıldı.

3.5. HAZIRLANAN NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

Üretilen propolis ve kuersetin nanopartiküllerinin karakterizasyonunu için SEM, FTIR, ZetaSizer, XRD, UV-VIS analizleri gerçekleştirildi.

3.5.1. ZetaSizer Analizi

Partikül boyutu ve partiküllerin dağılımı nanoformülasyonların *in vivo* toksisitesini, hedefleme, ilaç salımı, yükleme kapasitelerini ve kararlılığını belirlediği için önemli özellikler olarak kabul edilir (Mohanraj ve diğ., 2006). Propolis ve kuersetin yüklü PCL nanopartiküllerinin hidrodinamik boyutları, zeta potansiyelleri ve PDI değerlerinin ölçülmesi için, kapsüllemenin yıkama aşaması sonrasında pelletdeki süspanse nanopartiküllerden 5 µL alınarak santrifüj tüpüne aktarıldı ve son hacim distile su ile 1000 µL'ye tamamlandı (seyreltme). Tüpten 800 µL nanopartikül solüsyonu alınarak Kuvars (Quartz) spektrofotometre küvetine aktarıldı. Analizler Zeta Sizer cihazında (Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK) 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) kullanılarak 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirildi.

3.5.2. FTIR Analizi

Kapsüllemenin oluşumu ve ilaç moleküllerinin polikaprolakton polimeri ile etkileşiminin belirlenmesi için nanoformülasyonlar Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FTIR) cihazında (Shimadzu, Japan) elmas kristal - Zayıflatılmış Toplam Yansıma ("Attenuated Total Reflectance-ATR") modülü kullanılarak incelendi. Bunun için, tek başına propolis, kuersetin, polikaprolakton (kontrol örnekler) ve etkin maddelerin polikaprolakton ile kapsüllenmiş nanoformüllerinin FT-IR spektrumları 4000-600 cm⁻¹ aralığında ve 4 cm⁻¹ ayırma ile 100 tarama yapılarak belirlendi. Sonuçlar kızılötesi dalga boyunda geçirgenlik yüzdesi olarak değerlendirildi.

3.5.3. SEM Analizi

Polikaprolakton ile kapsüllenmiş propolis ve kuersetin nanopartiküllerin yüzey morfolojisi ve boyutları taramalı elektron mikroskobu (Zeiss EVO® LS 10) ile incelendi. Çok az miktarda propolis ve kuersetin nanopartikülleri çift taraflı karbon bant üzerine alındı ve vakum altında altın ile kaplandı. Daha sonra 7 kV'de farklı büyütme denemeleri ile mikroskobik analizler gerçekleştirildi ve fotomikrografikler elde edildi.

3.5.4. XRD Analizi

Hazırlanan propolis ve kuersetin yüklü PCL nanopartiküllerinin kristalin yapısını ortaya çıkarmak için X-ışını difraktometresi (PANalytical X'Pert PRO) ile Bakır (Cu) anod kaynağı

kullanılarak, dakikada 4° olacak şekilde, 20-80 θ (Theta) arasında, 25°C, 40 mA, 45 kV'de tarama yapıldı.

3.5.5. Reaksiyon Veriminin Belirlenmesi

Liyofilizasyon sonrası kurutulmuş nanopartiküllerin reaksiyon verimini tespit etmek için, mg olarak tartılan nanopartikül miktarının, başlangıçta kapsülleme için mg olarak kullanılan etken maddenin (Propolis, Kuersetin) ve polimerin (PCL) toplam miktarına oranı Denklem 3.1'de verilen formül ile belirlendi:

$$\text{Reaksiyon Verimi (\%)} = \frac{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçta kullanılan toplam madde miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5.6. Enkapsülasyon Etkinliğinin Belirlenmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin içerisine yüklenmiş propolis ve kuersetinin miktarlarını belirlemek için, yıkama basamaklarından sonra elde edilen toplam süpernatantlardan 1 mL alınarak 20 dakika, 12000 rpm'de santrifüj edildi. Bundan sonra süpernatantların UV-VIS spektrofotometrede (Jasco V-530) propolis için 315 nm, kuersetin içinse 385 nm dalga boyundaki absorpsanları ölçüldü. Kalibrasyon eğrileri kullanılarak nanopartiküle yüklenmiş kuersetin ve propolis etken maddelerinin miktarları hesaplandı ve enkapsülasyon etkinliği (% cinsinden) belirlendi (Denklem 3.2).

$$\text{Enkapsülasyon Etkinliği (\%)} = \frac{\text{Nanopartiküle yüklenen etken madde miktarı (mg)}}{\text{Başlangıçta kullanılan etken madde miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.5.7. Etken Madde (İlaç) Yükleme Kapasitesi

Nanokapsüllemede yükleme kapasitesi etken maddenin polimerde çözünürlüğü ile bağlantılıdır. Çözünürlük ise doğrudan polimerin yapısı, molekül ağırlığı, ilaç-polimer etkileşimi ve son fonksiyonel grupların (ester veya karboksil) varlığı ile ilişkilidir (Chawla ve Amiji, 2002). Etken yükleme kapasitesi aşağıdaki formül yardımıyla, nanopartiküle mg olarak

yüklenebilen etken madde miktarının, elde edilen nanopartikülün mg olarak toplam miktarına oranı hesaplanarak belirlendi (Denklem 3.3).

$$\text{Etken Yükleme Kapasitesi (\%)} = \frac{\text{Nanopartiküle yüklenen etkin madde miktarı (mg)}}{\text{Elde edilen nanopartikül miktarı (mg)}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.5.8. Nanopartiküllerin *In Vitro* Etken Madde (İlaç) Salımı Analizi

Hazırlanan propolis-PCL ve kuersetin-PCL nanopartiküllerinden etken madde (ilaç) salımının incelenmesi için, nanopartiküllerin PBS içerisinde 5 mg/mL konsantrasyondaki çözeltileri hazırlandı. Daha sonra hazırlanan çözeltiler 37°C çalkalamalı inkübatörde, 130 rpm’de 1 hafta ile 10 gün arasında inkübe edildi ve belirli zaman aralıklarında çözeltilerden 1’er mL alınarak 10.000 rpm’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Ardından süpernatantların uygun dalga boylarındaki (propolis için 315 nm; kuersetin için 385 nm) absorbansları UV-Vis spektrofotometresinde ölçüldü. Propolis ve kuersetin çözeltilerinin konsantrasyonları bu maddeler için önceden oluşturulmuş standart kalibrasyon eğrileri kullanılarak hesaplandı. İlaç salım miktarı zamana göre yüzde olarak grafiğe yansıtıldı.

3.6. ÇALIŞMADA KULLANILAN HÜCRE HATTI

Deneylerde Yıldız Teknik Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü “Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği” laboratuvarı kriyobankında bulunan ve dişi bir BALB/c fare tümöründen elde edilmiş J774 makrofaj hücreleri kullanıldı.

3.6.1. Makrofaj Hücrelerinin Kültürlenmesi

Makrofaj hücrelerinin kültürlenmesinde ve uygulamalarda kullanılmak üzere önce %10 sığır serumu (FBS) içeren RPMI 1640 besiyeri hazırlandı. Bunun için önce 50 mL’lik deney tüpüne 45 mL %1 antibiyotik (penisilin 100 U/mL; streptomisin 100 µg/mL) içeren “RPMI 1640 with stable Glutamine” (BioSera) besiyeri alındı ve son hacim “Standard Forte, South America, Fetal Bovine Serum with Additive FortiFier” (Pan-Biotech) ile 50 mL’ye tamamlandı.

Sıvı azot tankından çıkarılan J774 hücreleri 37°C su banyosunda (GFL, Kerman) çalkalandı. Çözülen hücreler steril kabinde (Laminar flow -Thermo Scientific Hera safe, Faster BHEN

2006) 15 mL'lik deney tüpüne alınarak üzerine 5 mL %10 FBS'li RPMI 1640 besiyeri eklendi ve 1000 rpm'e ayarlanmış santrifüjde (Eppendorf, Thermo Micromax RF) 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant steril pastör pipeti ile deney tüpünden uzaklaştırıldı ve hücre pelletinin üzerine 1 mL %10 FBS'li RPMI 1640 besiyeri eklendi. Ardından hücre sayımı yapılarak makrofaj hücrelerinin 25 cm²'lik T-25 flasklarına 5 mL besiyeri içerisinde ekimi gerçekleştirildi ve hücre kabı karbondioksitli etüve (New Brunswick Scientific CO-150 37°C) yerleştirildi. Her 24 saat sonunda hücrelerin morfolojisi ve proliferasyonu invert mikroskop (Olympus CKX41) kullanılarak incelendi. Kültürün başlatılmasından 7 gün sonra makrofaj hücrelerinin flask yüzeyine tutunduğu ve çoğaldığı gözlemlendi. Konfluent hücreler ekimin 1., 2. ve 3. gününde invert mikroskopta (Olympus CKX41) görüntülendi.

3.6.2. Hücre Sayımı

Kültürleme işlemlerinde santrifüj sonrasında elde edilen pelletdeki hücre süspansiyonunun üzeri önce %10 FBS ve %1 antibiyotik içeren RPMI-1640 (BioSera) besiyeri ile 1 mL'ye tamamlandı. Daha sonra mikrotüpe 48 µL besiyeri ve 50 µL tripan mavisini solüsyonu eklendi. Ardından bu tüpe, önceden hazırlanmış olan 1 mL'lik hücre süspansiyonundan 2 µL alınarak eklendi ve pipetaj yapıldı. Son olarak Thoma lamininin (Menzel Superior) kenarı boyunca her iki taraftan tripan mavisini ile boyanan hücre süspansiyonu yüklendi, mikroskopta incelendi ve üçlü çizgilerle ayrılmış 16 karedeki hücrelerin sayımı yapıldı. Hücre sayısı Denklem 3.4 yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı (1 mL)} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Sulandırma katsayısı} \times$$

$$\text{Thoma lamı Sabiti (10.000)} \quad (3.4)$$

Ortalama hücre sayısı: Thoma lamininin her iki tarafında bulunan 16 karedeki canlı hücrelerin aritmetik ortalaması

Sulandırma katsayısı: Santrifüj sonrası oluşan pelletten alınan hücrelerin sayımı için yapılmış sulandırma katsayısı

3.6.3. J774 Makrofaj Hücrelerinin Pasajlanması

J774 Makrofaj hücrelerinin ekildiği T25 flasklarda olan hücreler yüzey alanını %90 oranında kapladıktan sonra karbondioksitli etüvden (New Brunswick Scientific, CO-150 37°C) alındı ve yarı süspanse olan fare makrofaj hücrelerinin pasajı için el ile hafif şekilde flaskların kenarına vuruldu ve steril pastör pipeti kullanılarak flaskın iç yüzeyi çok hafif pipetaj yapılarak hücre süspansiyonu ile yıkandı. Daha sonra steril pipet ile 15 mL'lik deney tüplerine alınan hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücre sayımı gerçekleştirildikten sonra yeni T25 / T75 flasklara veya diğer hücre uygulama analizlerinin başlatılması için mikropalakalara ekim yapıldı.

3.6.4. Fare Makrofaj Hücrelerinin Kriyoprezervasyonu

J774 fare makrofaj hücrelerinin kriyoprezervasyonu için pasaj işlemi yapıldıktan sonra hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Tablo 3.2'de gösterildiği gibi % 20 FBS ve DMSO'dan oluşan kriyoprotektan hazırlandı. Kriyotüpe (1 mL) eklenen 10^6 makrofaj hücresi üzerine 50:50 oranında kriyoprotektan damlatıldı. Daha sonra yavaş dondurma işlemi başlatıldı. Kriyoprotektan solüsyonundaki makrofaj hücreleri ilk aşamada 1 saat +4°C; ikinci aşamada 2 saat -20°C; üçüncü aşamada ise bir gece -40°C'de tutularak -196°C sıvı azot tankına yerleştirildi.

3.7. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Propolis (etalonik ekstre), ticari Kuersetin ve bu maddelerle hazırlanmış PCL nanopartiküllerinin (Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) makrofaj hücrelerinin canlılığı ve immün yanıt üzerine etkilerinin belirlenmesi için, farklı deney grupları oluşturularak bu maddelerin belirli konsantrasyonları 96'lı hücre kültür kaplarındaki J774 makrofaj hücrelerine uygulandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: Çeşitli analizler için oluşturulan farklı deney grupları.

Analiz	Uygulanan etken maddeler, nanopartiküller ve konsantrasyonları	Kontrol gruplar	Uygulamalardaki tekrar sayısı	Uygulamalar sonrası inkübasyon süresi
MTT analizleri	Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL, Kuersetin-PCL; 5, 25, 50, 80, 100 µg/mL konsantrasyonlar	Birinci kontrol (Kontrol): Sadece makrofaj hücreleri içerir.	9	24, 48, 72 ve 96 saat sonra ölçümler alındı
NO tayini	Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL, Kuersetin-PCL; 5, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlar	İkinci kontrol (LPS): sadece LPS ile indüklenmiş makrofaj hücreleri içerir. Etken maddeler ve nanopartiküller uygulanmamıştır.	5	48 saat sonra ölçümler alındı
ELISA	Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL, Kuersetin-PCL; 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlar		3	48 saat sonra ölçümler alındı

3.8. PROPOLİSİN, KUERSETİNİN VE NANOPARTİKÜLLERİNİN SİTOTOKSİSİTE ANALİZLERİ

Hücrelere uygulanacak maddelerin J774 makrofaj hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi Mosmann (1983) tarafından önerilen MTT kolorimetrik yöntemiyle belirlendi. MTT yöntemi canlı hücrelerin MTT reaktifini (3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5- difenil tetrazolium bromür) mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi ile suda çözünemeyen formazan kristallerine dönüştürmesi ve daha sonra bu kristallerin DMSO ile çözündürülerek spektrofotometrede ölçümünü içerir.

Önce Tablo 3.2’de gösterildiği şekilde MTT’nin (Sigma Aldrich) PBS’de 10 mg/mL konsantrasyonda solüsyonu hazırlandı. Ardından hazırlanan solüsyon 0.22 µm’lik filtreden geçirildi.

Hücrelerin pasaj ve sayım işlemlerinden sonra 96’lık hücre kültür kaplarının her kuyucuğuna 100 µL hacimde 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Ekim sonrası kültür kapları 24 saat 37°C’de, karbondioksitli etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda makrofaj hücre kültürü üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı, Propolis, Kuersetin ve bu maddelerle hazırlanmış PCL nanopartikülleri (Propolis-PCL; Kuersetin-PCL) hücrelere uygulandı.

Hücelere uygulanan Propolis ve Kuersetinin stok solüsyonları dimetil sülfoksit içinde çözündürülerek hazırlandı. Nanopartiküllerin (Propolis-PCL, Kuersetin-PCL) stok solüsyonları steril PBS ile hazırlandı. Sitotoksisite analizleri için Propolis, Kuersetin ve nanopartiküllerinin 5, 25, 50, 80, 100 µg/mL konsantrasyonları hücreler üzerinde denendi. Uygulamalardan önce ikinci kontrol kuyucukları (sadece LPS uygulanmış hücreler) ve örnek kuyucukları ticari olarak temin edilmiş, 1 µg/mL konsantrasyonda *E.coli* LPS ile en az 6 saat indüklendi (Manjeet ve Ghosh, 1999). Uygulamalarda kuyucuklardaki DMSO’nun son konsantrasyonu %1’i geçmedi. Hücre kültürü kapları 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle etüvde tekrar inkübe edildi.

Etüvden alınan 96’lı hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 10 µL MTT solüsyonu eklendi ve 3 saat 37°C’lik karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda invert mikroskopta (Olympus CKX41) formazan kristalleri gözlemlendi. Kristallerin çözünmesi için her bir kuyucuğa 100 µL steril dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve çözeltinin homojen hale gelmesi için kültür kabı oda sıcaklığında çalkalandı (160 devir/dakika, Heidolph Unimax 1010). Hücre kültür kabı 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Mikroplaka okuyucuda (EON, BioTek Instruments Inc.) 560 nm dalga boyundaki absorbands ölçümleri alındı ve elde edilen absorbands değerleri kontrole göre karşılaştırılarak aşağıdaki formül yardımıyla hücrelerin canlılığı % cinsinden belirlendi (Denklem 3.5).

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Deney grubuna ait absorbands}}{\text{Kontrole ait absorbands}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.9. PROPOLİS, KUERSETİN VE NANOPARTİKÜLLERİNİN İMMÜN YANIT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin immün yanıt üzerine etkisinin (NO salımı, anti-enflamatuvar ve pro-enflamatuvar sitokinlerin protein düzeyleri) araştırılması için, deney planına uygun şekilde (Tablo 3.4) 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında J774 makrofaj hücrelerinin ekimi ve etüvde (37°C) 24 saat inkübasyonu yapıldı. Daha sonra *E.coli* LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerine önceden belirlenen toksik olmayan konsantrasyonlarda maddeler uygulandı. 37°C'de, karbondioksitli etüvde 48 saat tekrar inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki süpernatantlar toplandı ve ölçümler alındı.

3.9.1. Griess Reaktifi ile NO Tayini

Griess reaksiyonu 1879 yılında ilk kez Johann Peter Griess tarafından nitrit (NO_2^-) düzeylerinin belirlenmesi için önerilmiştir. Griess metodu, asidik (fosforik asit) koşullar altında, primer bir aromatik amin olan sülfanilamidin diazotizasyonu ve N-(1-naftil)etilendiamin hidroklorür (NED) ile mor renkli bir azo ürünü oluşturmaya dayanır (Tsikas, 2007).

NO miktarının tayini için önce Tablo 3.2'de gösterildiği şekilde Griess solüsyonu hazırlandı. 96'lık mikropalakalarda Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin uygulanmış olduğu kuyucuklardan besiyeri toplandı. Ardından yeni bir hücre kültürü kabında her kuyucuğa deney grubu ve konsantrasyonlarına uygun şekilde 50 µL test maddesi eklendi. Daha sonra kuyucuklardaki besiyerlerinin üzerine 50 µL Griess solüsyonu eklendi ve mikropalaka 10 dakika karanlık ortamda bekletildi. Son olarak 540 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucuda (EON, BioTek Instruments Inc.) absorbans değerleri ölçüldü. Nitrit konsantrasyonlarının belirlenmesi için standart nitrit kalibrasyon eğrisinden yararlanıldı.

3.9.2. İmmün Yanıtla İlişkili Sitokinlerin Protein Düzeylerinin Ölçülmesi.

Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin immün yanıtla ilişkili pro-enflamatuvar ve anti-enflamatuvar sitokinlerin düzeyine etkisi enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) ile incelendi. ELISA kitleri (Bioassay Technology Laboratory, China) ticari olarak temin edildi. Bu kitler serum, plazma, doku ve diğer biyolojik sıvılardaki fare IL-1β; IL-4 ve IFN-γ sitokinlerinin *in vitro* kantitatif ölçümü (düzeylerinin belirlenmesi) için uygundur. Kitlerin içeriğindeki mikropalakaların (strip) kuyucukları fare IL-4, IFN-γ ve IL-1β sitokinlerine

özgü antikorlarla önceden kaplanmıştır. Mikroplaklara eklenen örneklerin içerdiği sitokinler, kuyucuklardaki sitokin antikoruna bağlanır. Ardından eklenen fare sitokinlerine özgü biyotinile tespit antikorları örneklerdeki uygun sitokine bağlanır. Sonraki basamakta eklenen HRP konjüge Streptavidin, biyotinile sitokin antikoruna bağlanır. İnkübasyon sonrası bağlanmayan Streptavidin-HRP'nin uzaklaştırılması için yıkama işlemi gerçekleştirilir. Substrat solüsyonu eklenir ve sitokin miktarına bağlı renk değişimi gözlemlenir. Son olarak asidik durdurma solüsyonu eklenerek 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülür.

Kör örnek (standart solüsyonu ve standart seyreltici) için okunan absorbans değerleri uygun fare sitokini konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Bu analizler üretici firmanın her kite özgü önerdiği protokollere göre aşağıdaki işlem basamaklarıyla gerçekleştirildi:

- Önce hücre kültür kaplarından uygulamalar sonrası toplanan besiyerleri 20 dakika (2-8°C) 1000xg'de santrifüjlendi, besiyerinde olan hücre veya uygulanan maddeler çöktürüldü. Şeffaf besiyeri toplandı.
- Orjinal standart ELISA kitinin önerdiği şekilde seyreltilerek her sitokine özgü 5 farklı konsantrasyonda standartlar elde edildi. Kör örnek ("blank") - standart seyreltici. Standart konsantrasyonları aşağıdaki gibidir:

IL-4 için: 50, 100, 200, 400, 800 ng/L;

IFN- γ için: 40, 80, 160, 320, 640 ng/L;

IL-1 β için: 150, 300, 600, 1200, 2400 ng/L.

- Kitteki 20 mL Yıkama Tamponu distile su ile 500 mL'ye tamamlandı (25x seyreltme).
- Standart kuyucuklarına 50 μ L önceden seyreltilmiş standartlar eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 40 μ L örneklerden eklendi.
- Örnek kuyucuklarına 10 μ L uygun sitokin antikorları eklendi.

- Örnek kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 μ L streptavidin-HRP eklendi (sıfır standart kuyucuğu hariç).
- Mikroplaka yapışkan örtücü (“sealer”) ile kapatıldı ve 60 dakika etüvde (37°C) inkübasyona bırakıldı.
- Etüvden alınan mikroplakadan yapışkan örtücü kaldırıldı ve kuyucuklar 5 kere Yıkama Tamponu (25x) ile yıkandı.
- Yıkama aşamasının ardından her kuyucuğa 50 μ L substrat solüsyonu A ve sonra 50 μ L substrat B solüsyonu eklendi, mikroplaka tekrar yeni yapışkan örtücü ile kapatılarak 10 dakika etüvde (37°C) inkübasyona bırakıldı.
- Son olarak her kuyucuğa 50 μ L asidik durdurma solüsyonu (“Stop Solution”) eklendi ve mavi rengin anında sarı renge dönüşümü gözlemlendi. Bekleme süresi 10 dakikayı aşmamak şartıyla 450 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda (ThermoScientific Multiscan) absorbans ölçümleri alındı.

Örneklerdeki sitokin düzeylerinin belirlenmesi için üretici firmanın kitlelere özgü önerdiği protokollere göre standart eğri grafiği hazırlandı. Bunun için, her sitokin için ayrı olmak üzere, seyreltilen standartların konsantrasyonları Y eksenine, 450 nm dalga boyunda standartlara özgü absorbans değerleri ise X eksenine koyuldu ve Standart Eğri Grafiği oluşturuldu. Bu eğrilerdeki denklemlerden yararlanarak örneklerdeki IL-4, IFN- γ ve IL-1 β sitokinlerinin miktarları pg sitokin/mL cinsinden ifade edildi.

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen sitotoksosite (MTT yöntemi) ve immün yanıtla ilişkili analizlere (Griess ve ELISA yöntemleri) ait tüm sayısal bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Aritmetik ortalamalar ve standart sapma GraphPad Prism® 7.00 programı kullanılarak hesaplandı. Gruplar arasındaki farkların anlamlı olup olmadığını belirlemek için tek-yönlü ANOVA (tek yönlü varyans analizi) ve onu takiben üst test olarak Dunnett’s testi kullanıldı. Analizlerde anlamlılık sınırı $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRESİ

Deneylerde ham propolisin %70 etanol ile hazırlanan ekstresi kullanıldı (Şekil 4.1). Ekstraksiyon sonunda 50 g ham propolisten 4 g propolis etanolik ekstresi elde edildi. Bu ekstrenin suda, PBS’de ve besiyerinde (RPMI 1640) yeterince çözünmediği, DMSO ve etanolde ise kolayca çözünebildiği gözlemlendi.



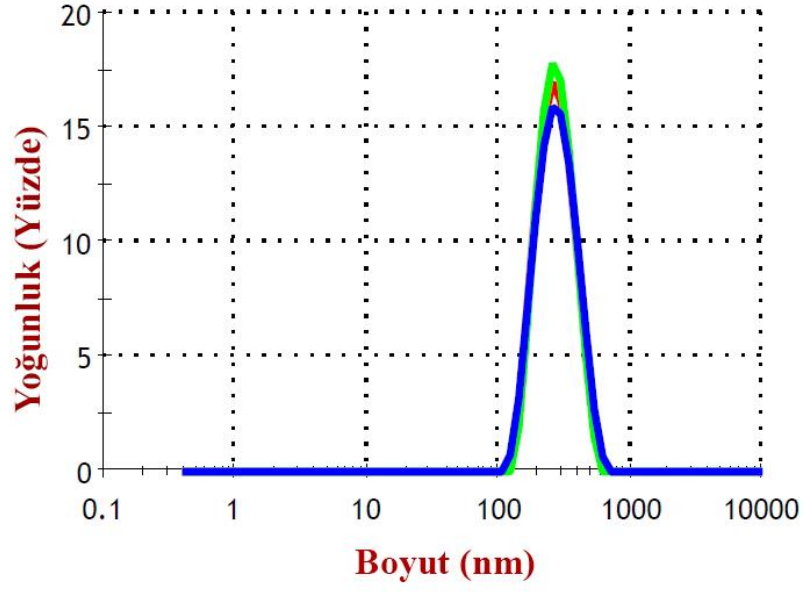
Şekil 4.1: Deneylerde kullanılan Propolis örneğinin (propolis etanolik ekstresinin) genel görünümü.

4.2. NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

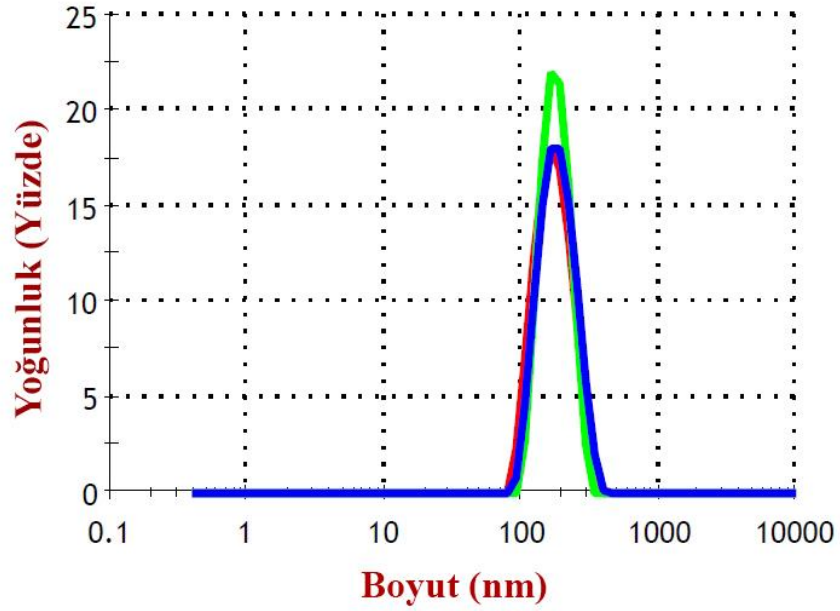
4.2.1. Nanopartiküllerin Boyutları

Dinamik ışık saçılımı ile 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) koşullarında Zetasizer cihazında (Nano ZS, Malvern, UK) nanoformülasyonlar için yapılan 3 okuma (“record 1, 2, 3”) sonucunda

Propolis-PCL nanopartikülü için 280 nm, 281 nm, 286 nm (Şekil 4.2); Kuersetin-PCL nanopartikülü için ise 177 nm, 180 nm, 187 nm (Şekil 4.3) değerleri elde edildi.



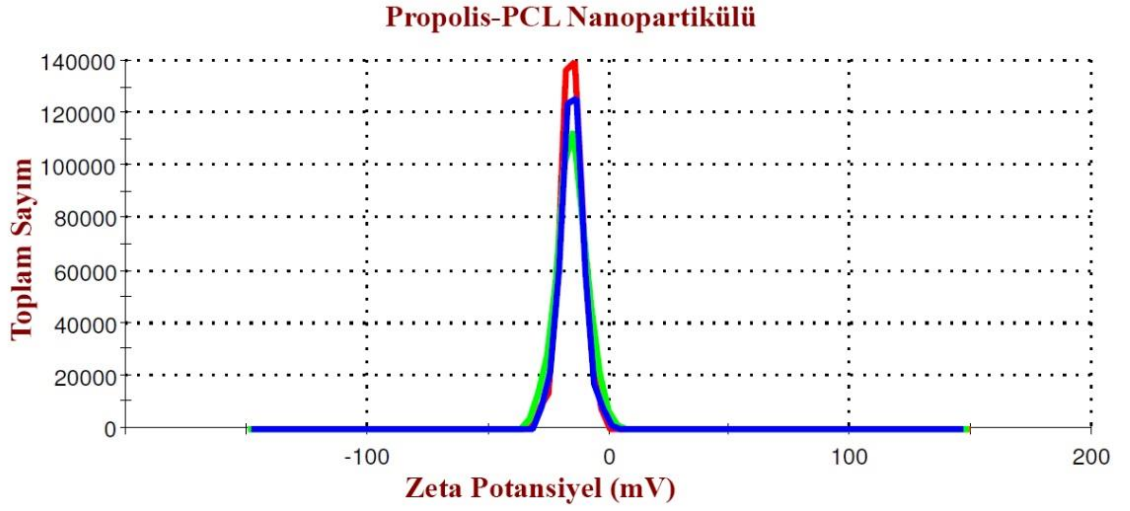
Şekil 4.2: Propolis-PCL nanopartikülünün yoğunluk yüzdesine göre boyut dağılımı.



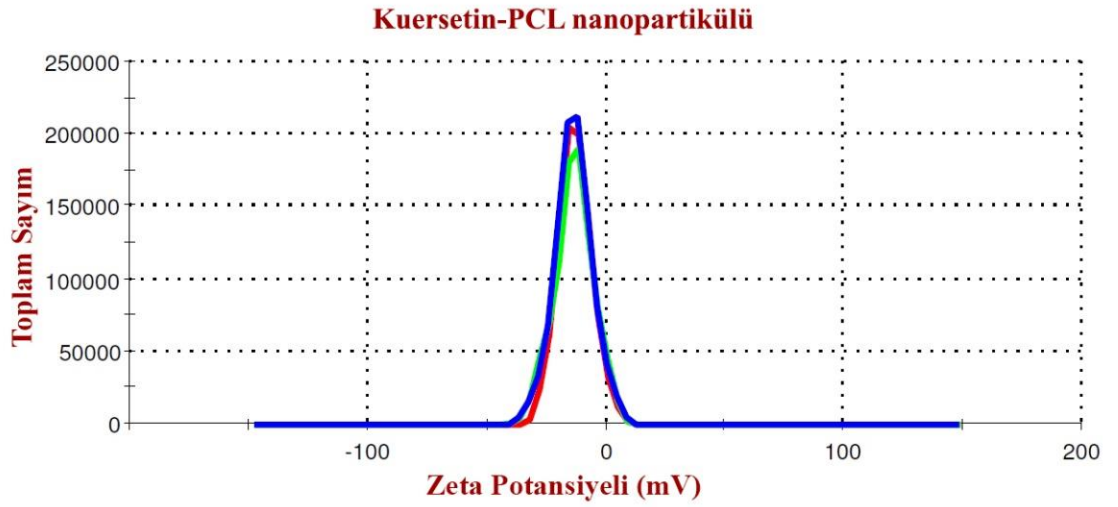
Şekil 4.3: Kuersetin-PCL nanopartikülünün yoğunluk yüzdesine göre boyut dağılımı.

4.2.2. Nanopartiküllerin Zeta Potansiyelleri

Zetasizer cihazında (Nano ZS, Malvern, UK) lazer doppler mikro elektroforezi ile nanoformülasyonlar için 3 bağımsız tekrarlar (“replica”) yapılan 3 ayrı okumada (“record 1, 2, 3”, sırasıyla kırmızı, mavi ve yeşil) Zeta Potansiyelleri ortalama olarak Propolis-PCL nanopartikülü için -15.4 mV (Şekil 4.4); Kuersetin-PCL nanopartikülü için ise -18.9 mV (Şekil 4.5) olarak ölçüldü.



Şekil 4.4: Propolis-PCL nanopartikülünün Zeta potansiyel değerleri.



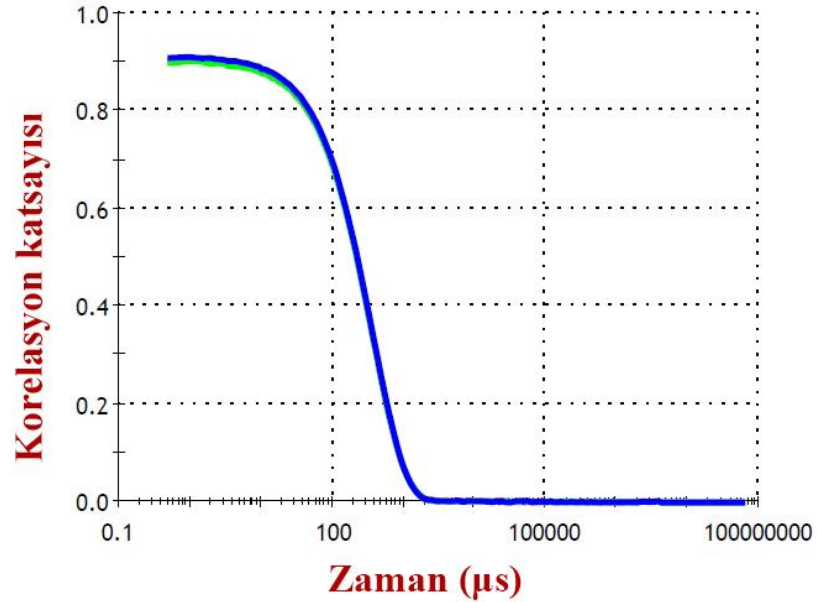
Şekil 4.5: Kuersetin-PCL nanopartikülünün Zeta potansiyel değerleri.

4.2.3. Nanopartiküllerin Çoklu Dağılım Endeksi (PDI) Değerleri

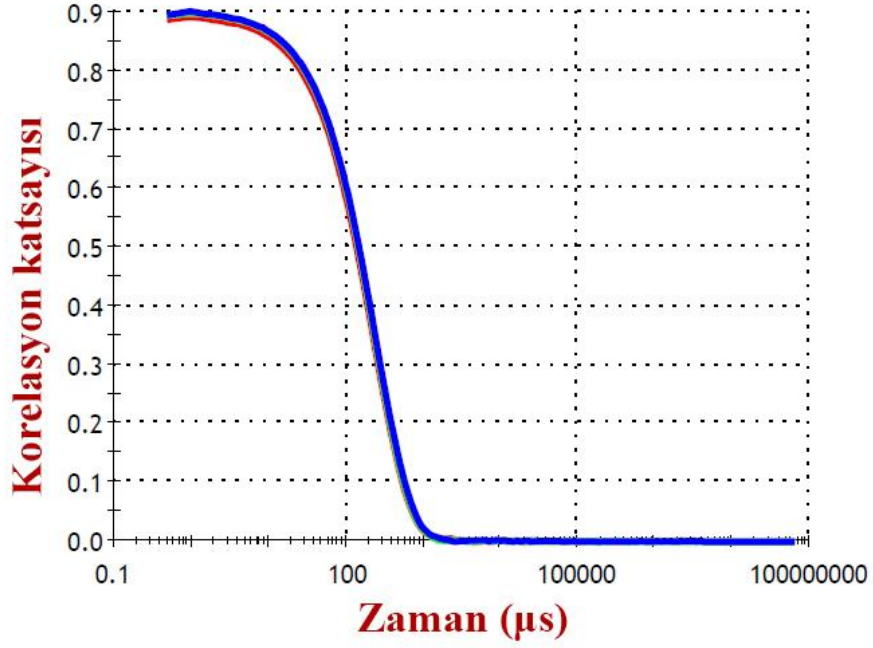
ZetaSizer cihazında 3 bağımsız tekrarla yapılan 3 ayrı okumada, Propolis ve Kuersetin yüklü PCL nanoformülasyonlarının PDI değerlerinin 0.1'den küçük olduğu belirlendi (Tablo 4.1). Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin boyut analizlerinde zamana göre korelasyon katsayısı değişimleri, sırasıyla Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de verildi.

Tablo 4.1: Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin çoklu dağılım endeksi (PDI) değerleri.

Nanoformülasyon	PDI değerleri
Propolis-PCL	1. Okuma: 0.090
	2. Okuma: 0.084
	3. Okuma: 0.086
Kuersetin-PCL	1. Okuma: 0.073
	2. Okuma: 0.049
	3. Okuma: 0.088



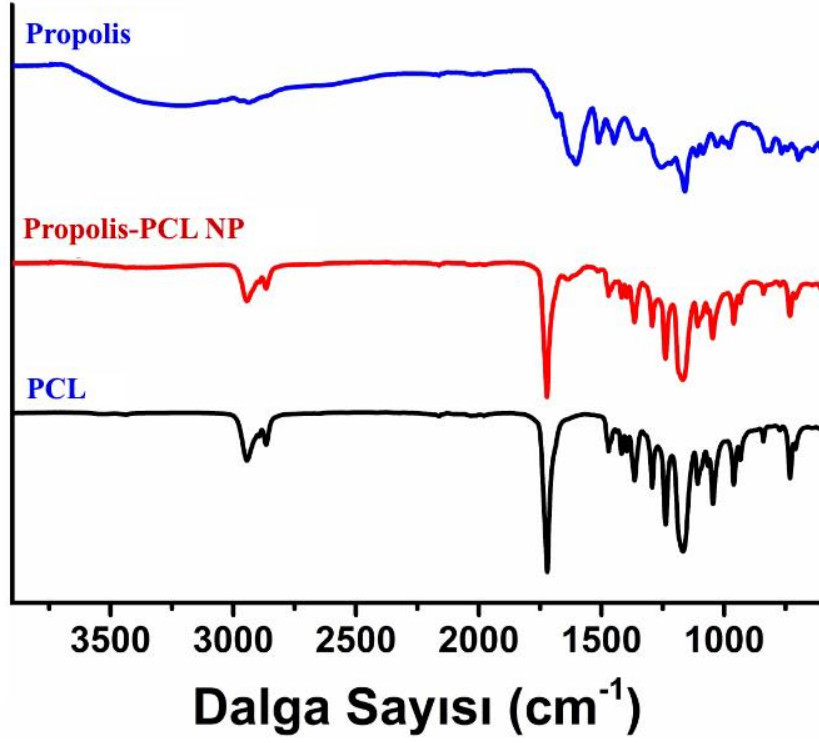
Şekil 4.6: Propolis-PCL nanopartikülünün boyut analizlerinde zamana göre korelasyon katsayısı değişimi.



Şekil 4.7: Kuersetin-PCL nanopartikülünün boyut analizlerinde zamana göre korelasyon katsayısı değişimi.

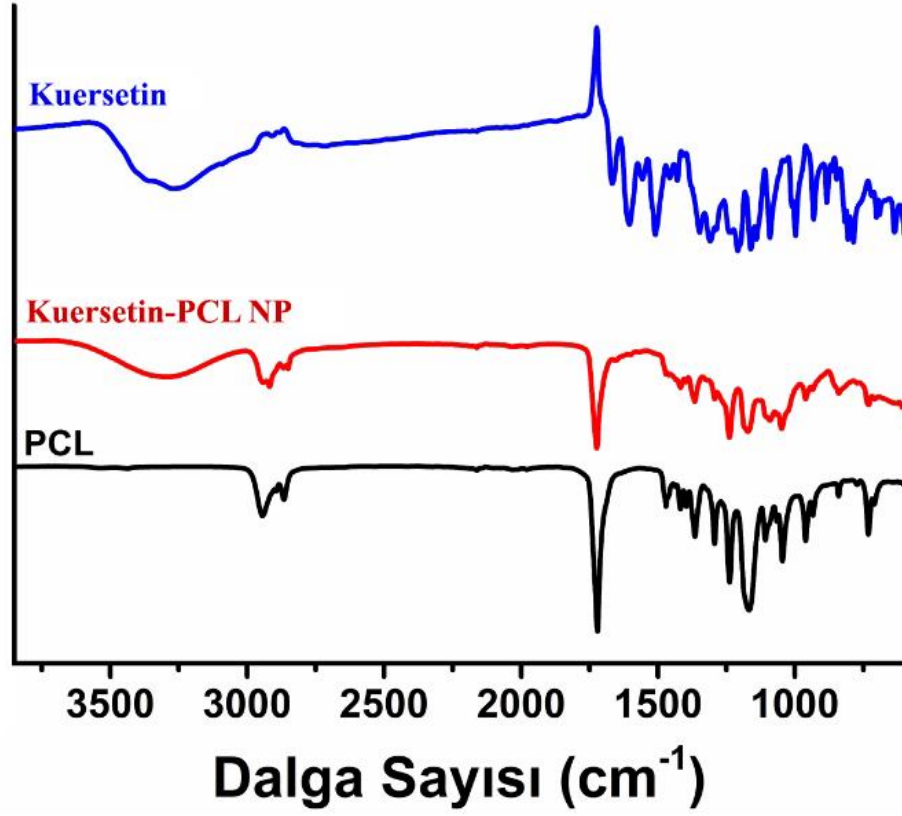
4.2.4. FTIR Analizi Sonuçları

Propolisin FT-IR spektrumu Şekil 4.8’de verildi. Bu spektrumda 2950 cm^{-1} ve 2850 cm^{-1} ’de gözlenen piklerin (doymuş hidrokarbonun CH_2 grupları ile ilişkili) uzun zincirli alkil bileşikleri sayesinde olduğu düşünülmektedir. $1100\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ arası pikler propolisin içerdiği lipidleri ve flavonoidleri ifade etmektedir (Rassu ve diğ., 2015). 1045 cm^{-1} civarında çıkan pikler propolis ekstresindeki alkollerin, karboksilik asitlerin, esterlerin ve eterlerin varlığını göstermektedir (Sherif ve diğ., 2018).



Şekil 4.8: Propolis (etanolik ekstresi), boş polikaprolakton (PCL) nanopartikülü ve Propolis-PCL nanopartikülünün FTIR spektrumları.

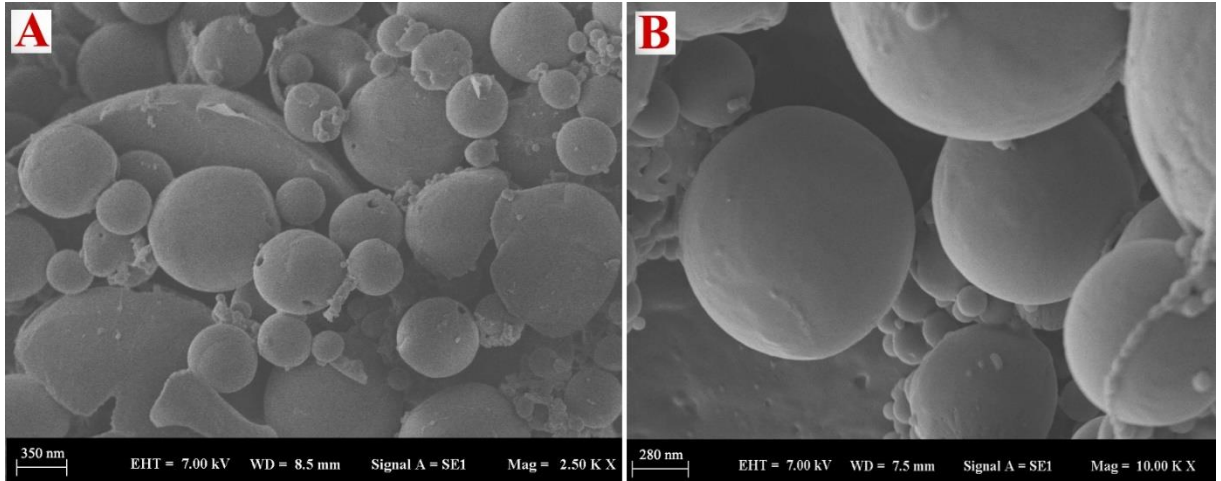
Kuersetin için temel karakteristik pikler 1100-1600 cm⁻¹ aralığında ve 1200-1400 cm⁻¹ aralığındaki (-OH) fenolik bandı, hem kuersetin flavonoidine, hem de Kuersetin-PCL nanopartikülüne ait spektrumlarda görüldü (Kumari ve diğ., 2010). PCL'nin C=O grubu ile ilişkili sert pikler 1700 cm⁻¹ dalga boyunda tespit edildi. Kuersetin flavonoidine özgün dalgalanmaların Kuersetin-PCL nanopartiküllerinde de gözlemlenmesi, bu flavonoidin PCL ile kapsüllendiğinin dolaylı göstergesidir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Kuersetin flavonoidi, boş polikaprolakton (PCL) nanopartikülü ve Kuersetin-PCL nanopartikülünün FTIR spektrumları.

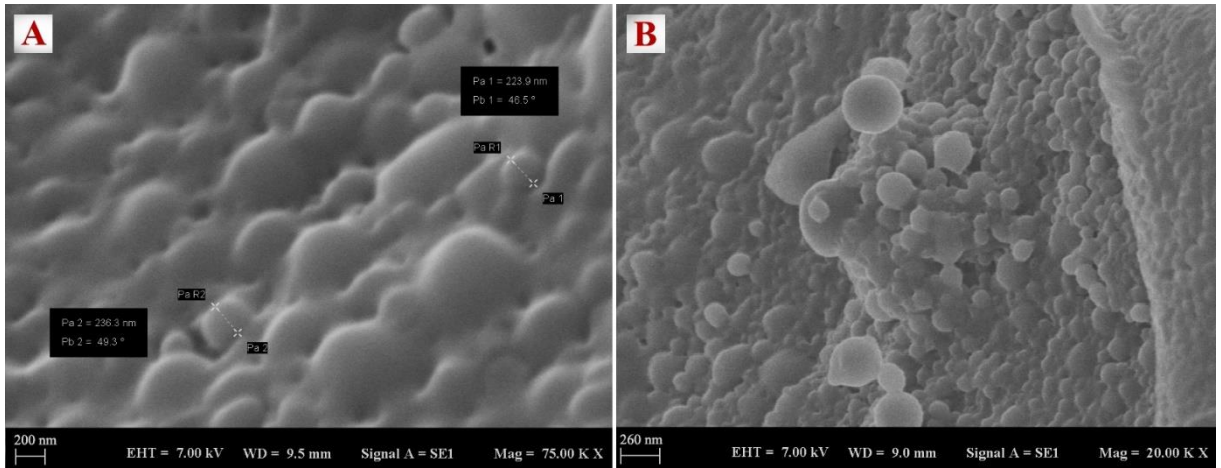
4.2.5. Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleri

Propolis-PCL nanoformülasyonlarının 2500X ve 10.000X büyütme ile alınmış SEM görüntülerine dayanarak yapılan morfolojik incelemeler ve boyut analizleri, düzgün yüzeyli küresel biçime ve ortalama 280-350 nm partikül boyutuna sahip olduklarını ortaya koydu (Şekil 4.10). İncelenen alanlarda daha büyük (mikro boyutta) partiküllerin yanı sıra, daha çok nano boyuttaki partiküllerin bulunduğu saptandı.



Şekil 4.10: Propolis-PCL nanopartiküllerinin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri (A-2500X; B-10.000X)

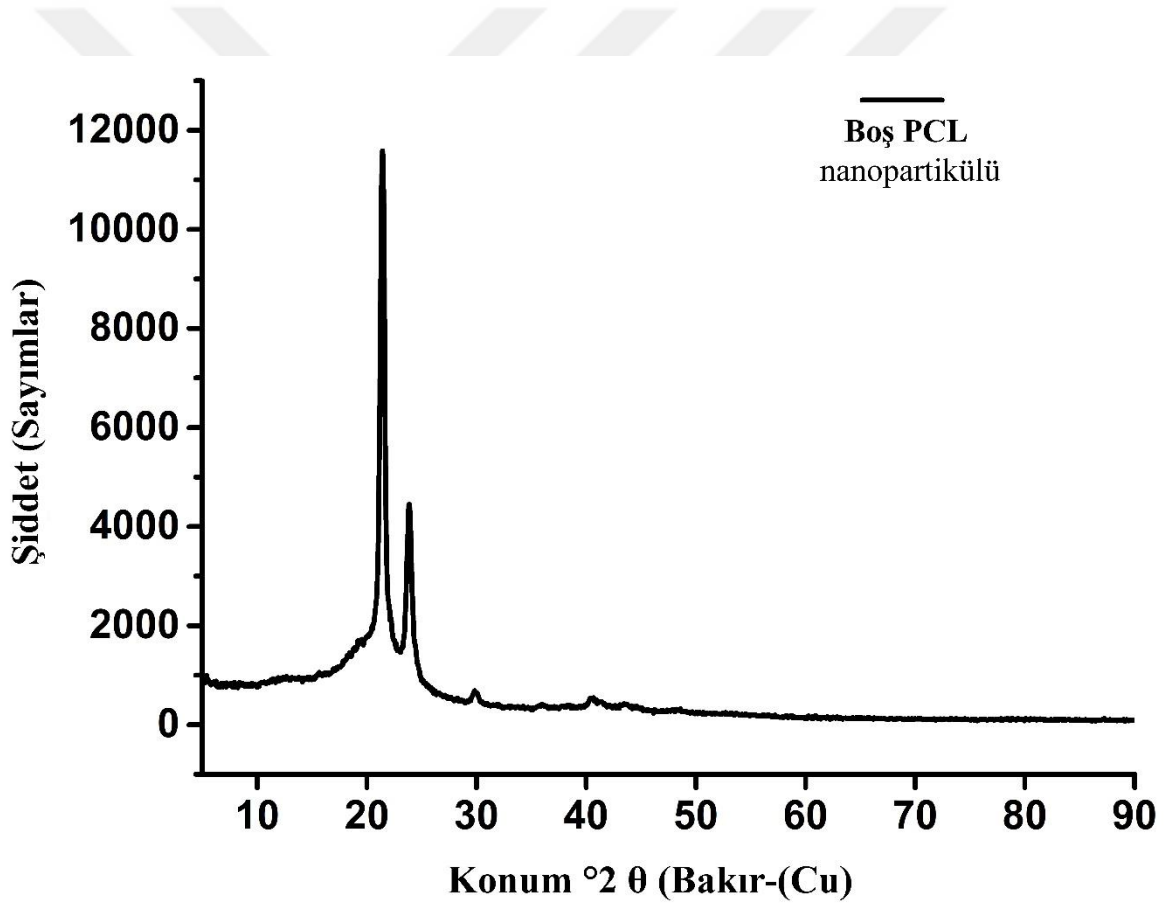
Kuersetin-PCL nanoformülasyonlarının 75.000X ve 20.000X büyütme ile alınmış SEM görüntüleri (Şekil 4.11), boyutlarının ortalama 200-260 nm olduğunu ve çok daha sıkı şekilde kümelenmiş küresel yapılar oluşturduklarını ortaya koydu.



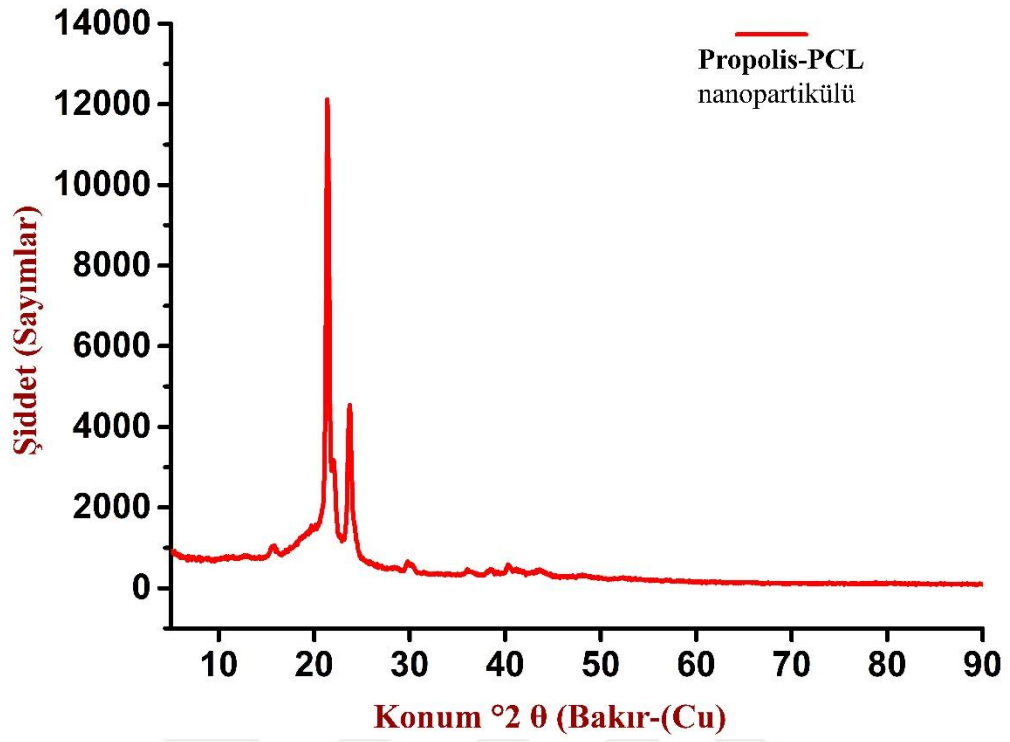
Şekil 4.11: Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (A-75.000X; B-20.000X).

4.2.6. XRD analizi sonuçları

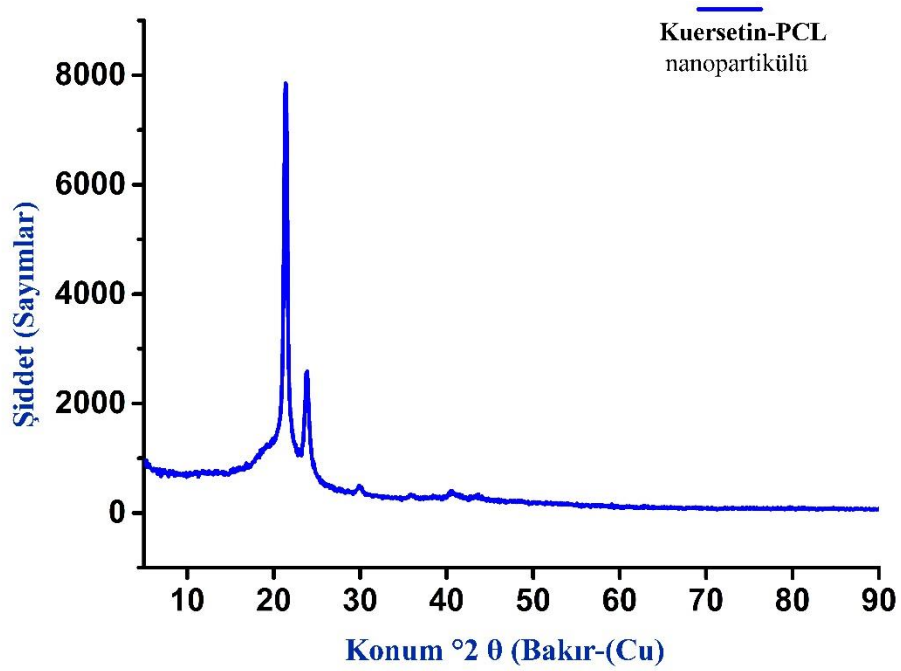
XRD analizi ile, etken maddelerin yüklenmediği boş PCL nanopartikülleri için $2\theta = 21.5^\circ$ ve 23.8° Bragg açılarında iki sert kırınım piki (dalga yükselmesi) tespit edildi (Şekil 4.12). Bu değerler polietilen benzeri kristal yapıyı (amorf) yansıtmaktadır (Borjigin ve diğ., 2013). Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanoformülasyonlarının X-ışını difraksiyon grafiklerinde PCL için karakteristik iki sert kırınım piki aynı konumda (21° - 24° Bragg açıları) gözlemlendi. Ayrıca, Propolis-PCL nanopartikülleri için $2\theta = 22^\circ$ Bragg açısında yeni bir kırınım piki tespit edildi (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).



Şekil 4.12: Boş (ilaç yüklenmeyen) PCL nanopartiküllerinin XRD spektrumu.



Şekil 4.13: Propolis-PCL nanopartiküllerinin XRD spektrumu.



Şekil 4.14: Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin XRD spektrumu.

4.2.7. Nanokapsüllemede Reaksiyon Verimi, Enkapsülasyon Etkinliği ve Etken Yükleme Kapasitesi

Nanopartiküllerin enkapsülasyonunda elde edilen reaksiyon verimleri, enkapsülasyon etkinlikleri ve etken yükleme kapasiteleri Tablo 4.2’de verildi. Kuersetin-PCL nanopartikülünün reaksiyon verimi yüzdesi hariç, diğer tüm değerler propolis ve kuersetinin PCL ile kapsüllendiğinin iyi birer göstergesidir. Propolis-PCL nanopartikülü için % 83 enkapsülasyon etkinliği propolisin PCL polimerine büyük oranda yüklendiğine işaret etmektedir.

Tablo 4.2: Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin Etken Yükleme Kapasiteleri, Reaksiyon Verimleri ve Enkapsülasyon Etkinliği.

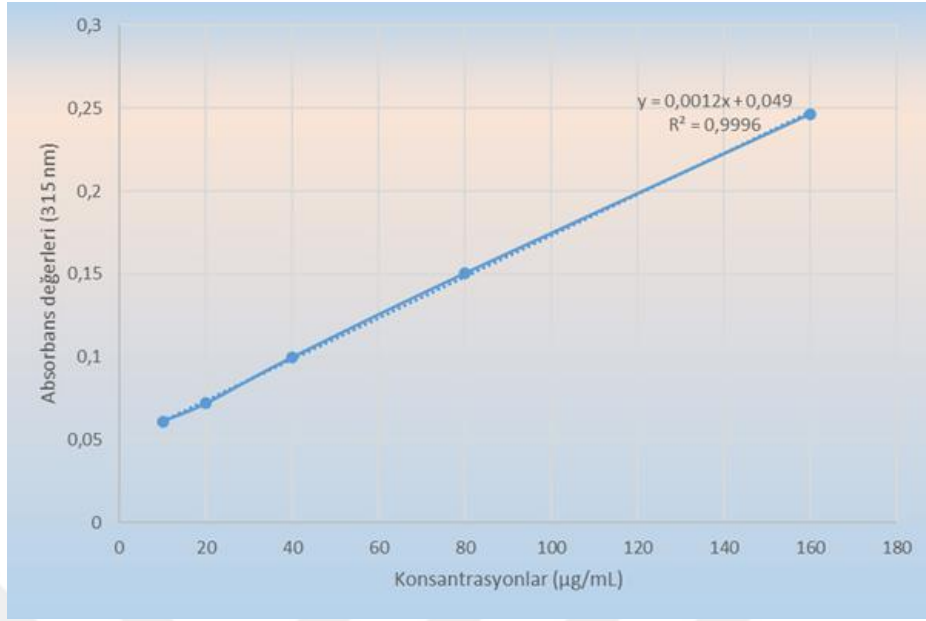
Nanoformülasyon	Etken Yükleme Kapasiteleri	Reaksiyon Verimleri	Enkapsülasyon Etkinliği
Propolis-PCL	%75	%63	%83
Kuersetin-PCL	%68	%51	%76

4.2.8. Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL Nanopartiküllerinin *In Vitro* Etken Madde (İlaç) Salımı

In vitro ilaç salımı deneylerinin ilk adımında nanopartiküllerden salınan serbest propolisi ve kuersetini ölçümlemek için kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Ardından nanopartiküllerin etken madde (ilaç) salımı Propolis –PCL için 240 saat, Kuersetin-PCL için 300 saat süreyle izlendi ve sonuçlar aşağıda ayrı başlıklar halinde verildi.

4.2.8.1. Propolisin Kalibrasyon Eğrisi

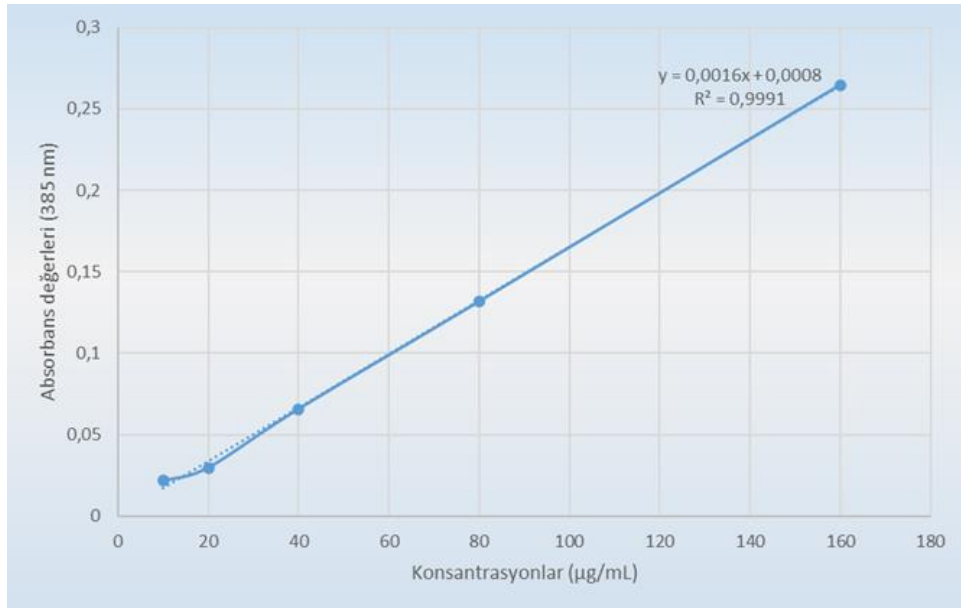
Beş farklı konsantrasyonda (10, 20, 40, 80 ve 160 µg/mL) hazırlanmış Propolis örneğinin (etanolik ekstre) konsantrasyon değerleri absise, bu çözeltilerin 315 nm dalga boyundaki absorbanları ordinata yerleştirilerek çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.15’teki gibidir.



Şekil 4.15: Propolis (etanolik ekstre) için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.

4.2.8.2. Kuersetinin Kalibrasyon Eğrisi

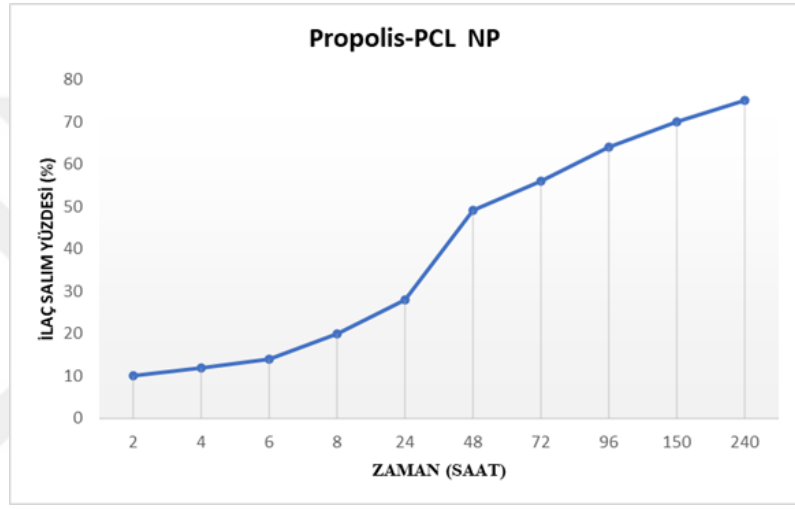
Beş farklı konsantrasyonda (10, 20, 40, 80 ve 160 µg/mL) hazırlanmış kuersetin çözeltilerinin 385 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinden yararlanarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi Şekil 4.16'daki gibidir.



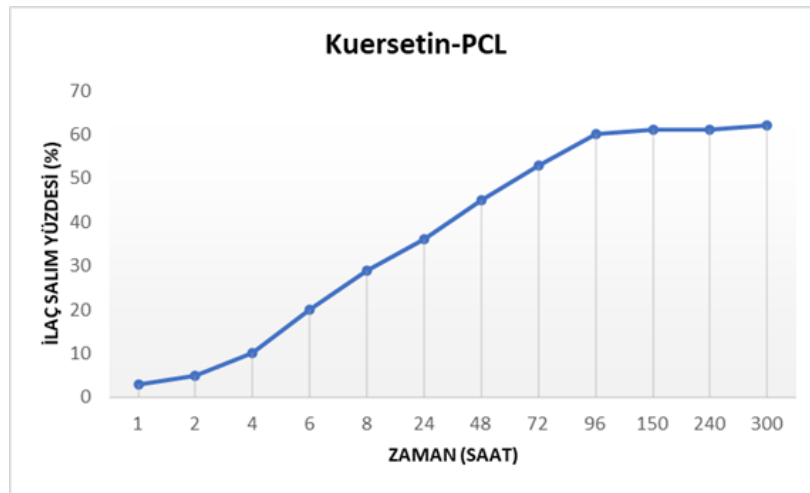
Şekil 4.16: Kuersetin için hazırlanmış kalibrasyon eğrisi.

4.2.8.3. Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'den Propolis ve Kuersetin Salımı

Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin PBS medyumuna sırasıyla 240 saat ve 300 saat süreyle ilaç salımı grafikleri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verildi. Buna göre, nanopartiküllerin zamanla düzenli bir şekilde artan ilaç salımı yaptıkları anlaşıldı. Propolis-PCL nanopartikülleri ilk 2 saat çok az salım yaparken, Kuersetin-PCL nanopartikülleri bu salım düzeyine ancak 4 saat sonra ulaştı. Propolis-PCL nanopartikülü 72 saat ve Kuersetin-PCL nanopartikülü ise 96 saat sonra % 60 üzerinde ilaç salımı gerçekleştirdi.



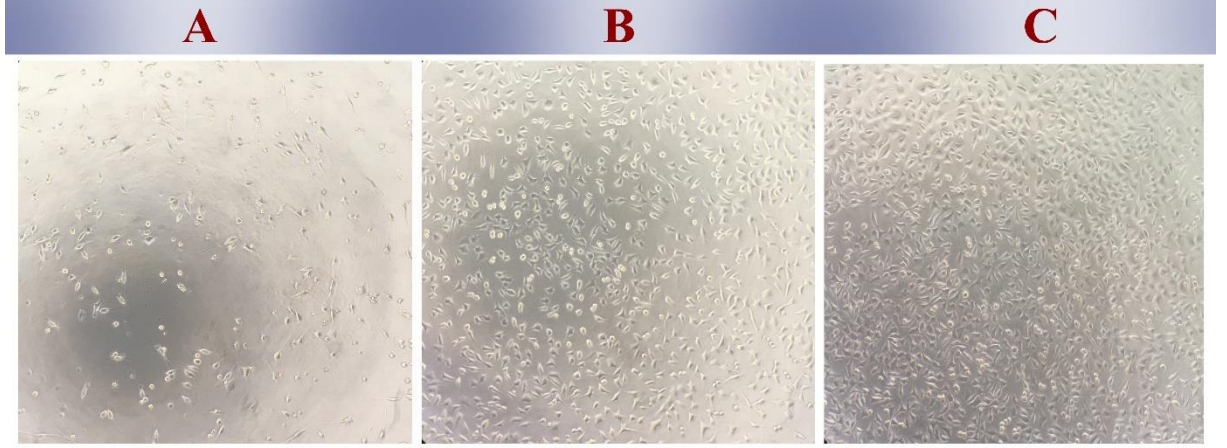
Şekil 4.17: Propolis-PCL nanopartiküllerinin zamana bağlı etken madde (ilaç) salım grafiği.



Şekil 4.18: Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin zamana bağlı etken madde (ilaç) salım grafiği.

4.3. J774 FARE MAKROFAJ HÜCRELERİNİN ÇOĞALMA DURUMLARI

Uygun besi ortamında çoğaltılan J774 fare makrofaj hücrelerinin çoğalma durumları 3 gün süreyle mikroskopta izlendi ve fotoğraflandı (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: Kültürlenen J774 fare makrofaj hücrelerinin invert mikroskoptaki (Olympus CKX41) görüntüleri (A, B, C, sırasıyla 1., 2. ve 3. günlerde konfluent hücrelerdeki artışı göstermektedir).

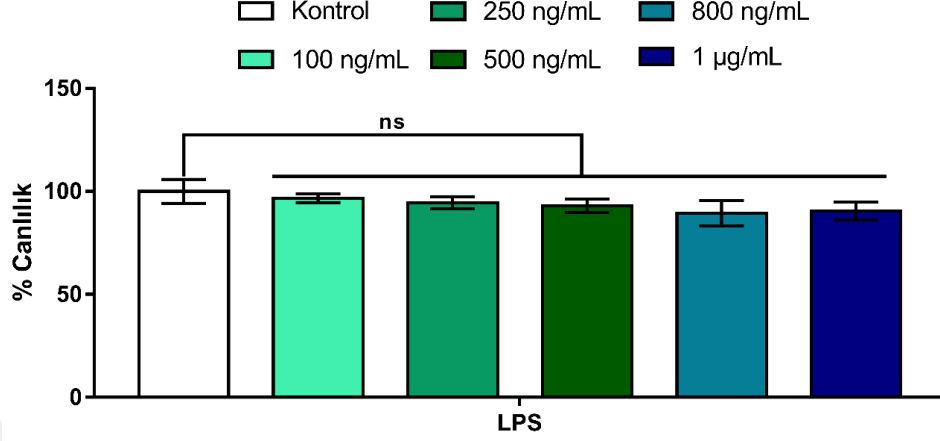
4.3. ETKEN MADDELERİN MAKROFAJ HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

4.3.1. Sitotoksisite Analizleri

Bu tez çalışmasında etken maddelerin (Propolis, Kuersetin ve bunların PCL ile enkapsüle edilmiş nanopartikülleri- Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek için MTT analizleri 9 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çalışma boyunca birinci kontrol grubu olarak herhangi bir etken madde ve LPS uygulanmamış hücreler (Kontrol) ve ikinci kontrol grubu olarak da sadece LPS uygulanmış hücreler (LPS) kullanıldı. Kontrol hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edildi. Deney grupları içindeki tekrarlar arasındaki tutarlılık tek yönlü ANOVA testi ile belirlendi ve üst test olarak Dunnett's testi kullanıldı.

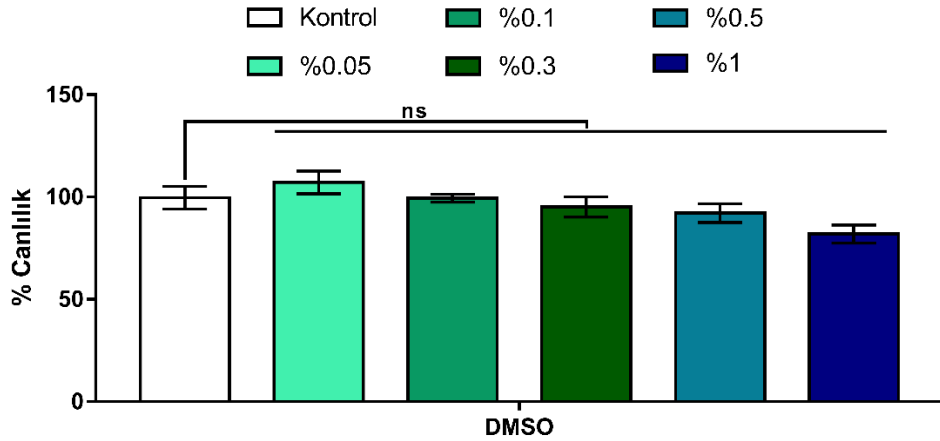
Makrofaj hücrelerinin indüklenmesi için deneylerde kullanılan *E.coli* lipopolisakkaridinin farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.20'de verildi. Kontrol ve

farklı LPS konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerin % canlılık oranları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi.



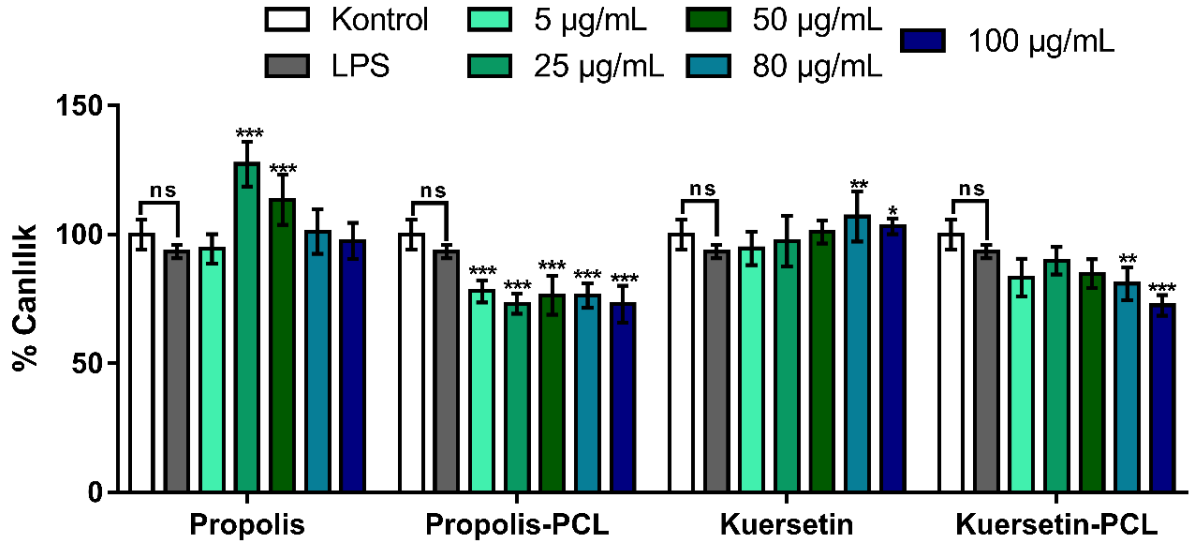
Şekil 4.20: *E.coli* LPS'nin J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= "not significant", anlamlı değildir).

Etkin maddelerin çözünmesi için kullanılan DMSO'nun farklı konsantrasyonlarının makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.21'de verildi. Kontrol grubu ve farklı DMSO konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerin % canlılık oranları arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı.



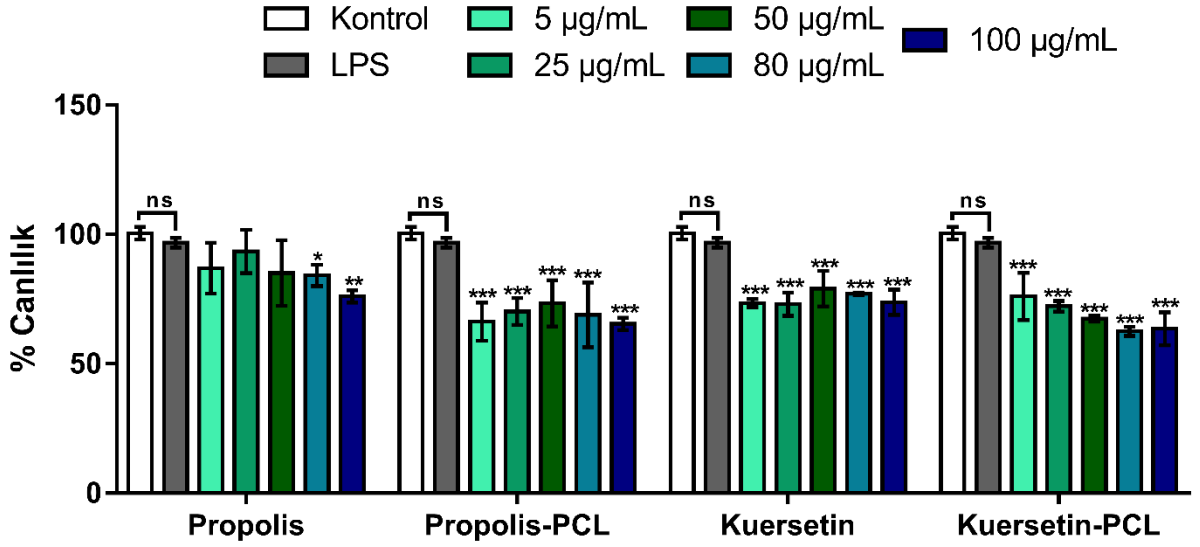
Şekil 4.21: Dimetil sülfoksitin J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= "not significant", anlamlı değildir).

J774 makrofaj hücrelerine uygulanan etken maddelerin, uygulamadan 24 saat sonra hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.22’de verildi. Kontrol ve LPS gruplarındaki hücrelerin % canlılık oranları arasında 24. saatte anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Propolisin 25 ve 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının canlılığı LPS grubuna göre anlamlı derecede artırdığı saptandı. Propolis-PCL’nin bütün dozları hücreler üzerinde LPS grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede sitotoksik etki gösterdi. Kuersetinin 80 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının makrofaj hücrelerinin canlılığını anlamlı derecede artırdığı gözlemlendi. Kuersetin-PCL nanopartikülünün 80 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları, LPS grubuna göre hücre canlılığını anlamlı derecede düşürdü.



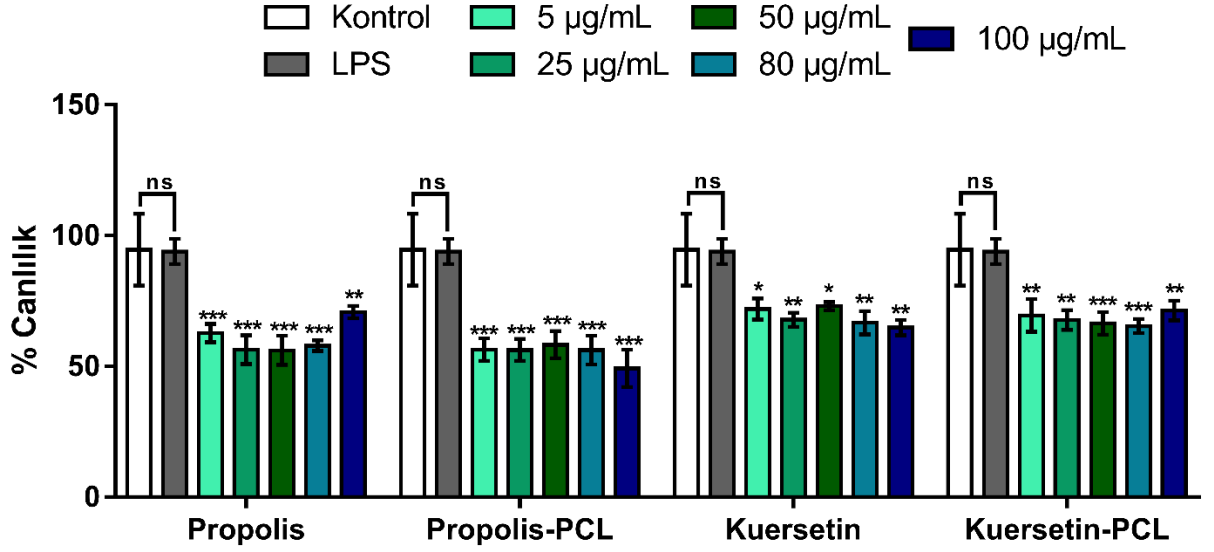
Şekil 4.22: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 24. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, LPS grubuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= “not significant”, anlamlı değildir).

J774 makrofaj hücrelerine uygulanan etken maddelerin, uygulamadan 48 saat sonra hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.23’de verildi. Kontrol ve LPS gruplarındaki hücrelerin % canlılık oranları arasında 48. saatte anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Propolisin 80 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarının, ayrıca Propolis-PCL, Kuersetin ve Kuersetin-PCL’nin bütün konsantrasyonlarının hücre canlılığını LPS grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşürdüğü tespit edildi. Hücre canlılığındaki düşüş son üç grupta daha fazlaydı.



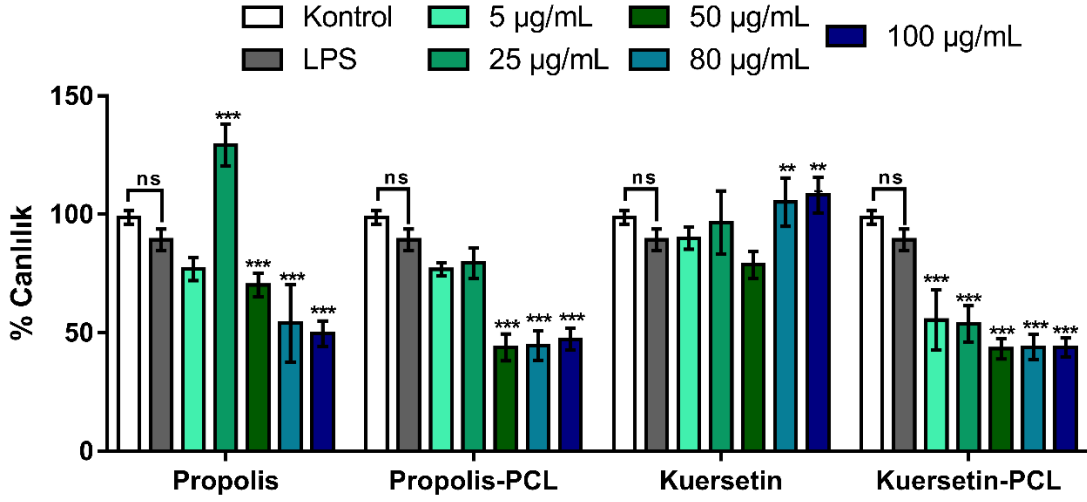
Şekil 4.23: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 48. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, LPS grubuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= “not significant”, anlamlı değildir).

J774 makrofaj hücrelerine uygulanan etken maddelerin, uygulamadan 72 saat sonra hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.24’de verildi. Kontrol ve LPS gruplarındaki hücrelerin % canlılık oranları arasında 72. saatte anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Propolis, Kuersetin ve nanopartiküllerin (Propolis-PCL, Kuersetin-PCL) bütün konsantrasyonlarının hücre canlılığını LPS grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşürdüğü saptandı.



Şekil 4.24: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 72. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (**P<0.01, ***P<0.001, LPS grupuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= “not significant”, anlamlı değildir).

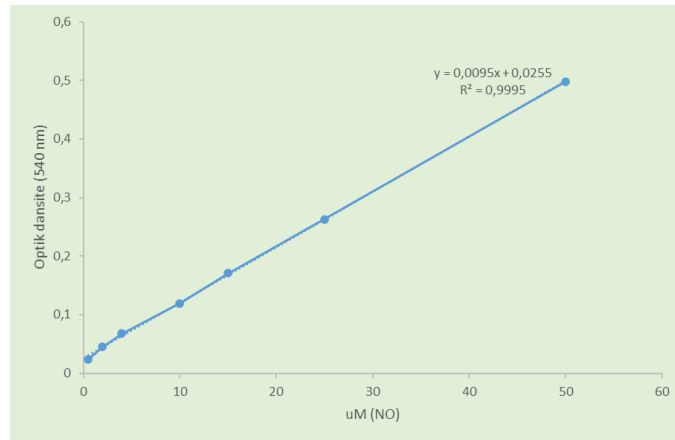
J774 makrofaj hücrelerine uygulanan etken maddelerin, uygulamadan 96 saat sonra hücre canlılığı üzerindeki etkileri Şekil 4.25'te verildi. Kontrol ve LPS gruplarındaki hücrelerin % canlılık oranları arasında 96. saatte anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Propolisin 25 µg/mL konsantrasyonu hücre canlılığını anlamlı derecede artırırken, ≥50 µg/mL konsantrasyonları tam tersi bir etki gösterdi. Kuersetinin 80 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonları canlı hücre yüzdesini düşürürken, 5, 25, 80 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde etkili olmadığı belirlendi. Propolis-PCL'nin ≥50 µg/mL konsantrasyonları ve Kuersetin-PCL'nin tüm konsantrasyonları, hücre canlılığını anlamlı derecede düşürdü. IC₅₀ değerleri Propolis-PCL için 36.44±1.53 µg/mL, Kuersetin-PCL için 26.3±2.76 µg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 4.25: Etken maddelerin (Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL) uygulamadan sonra 96. saatte, LPS ile indüklenmiş J774 makrofaj hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi (**P<0.01, ***P<0.001, LPS grubuna göre kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns = “not significant”, anlamlı değildir).

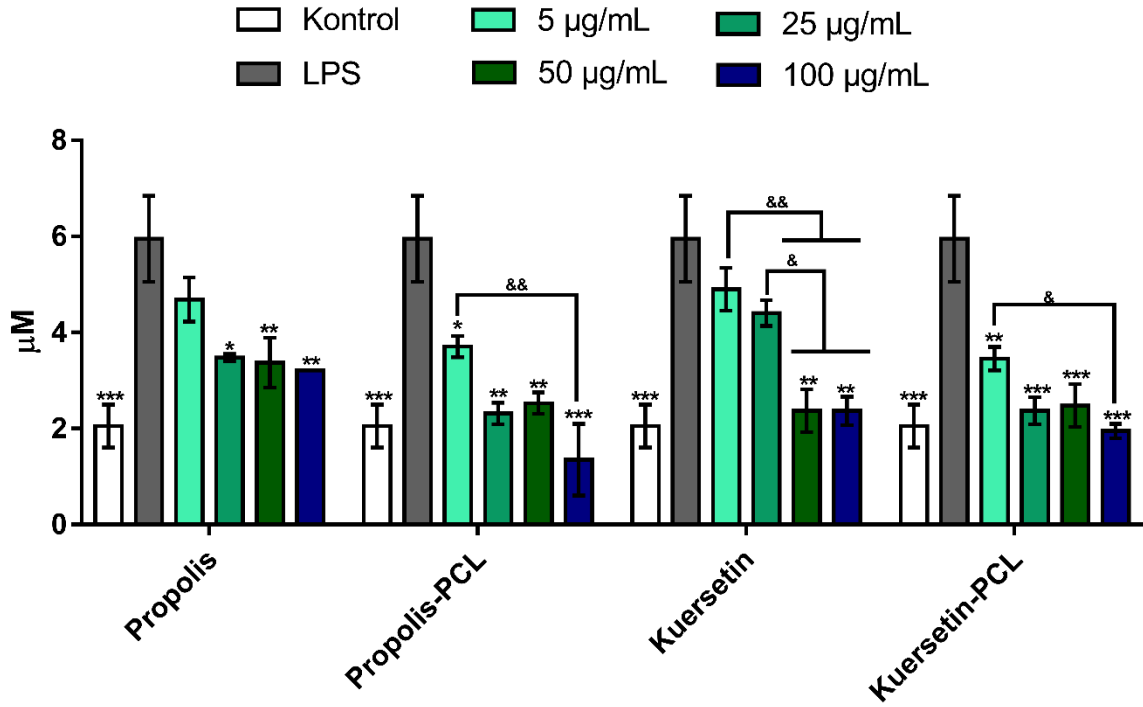
4.5. PROPOLİS, KUERSETİN, PROPOLİS-PCL VE KUERSETİN-PCL UYGULANMIŞ LPS-İNDÜKLÜ J774 MAKROFAJ HÜCRELERİNDEN NO SALIMI

Hücre kültürü uygulamalarından sonra mikropalakaların kuyucuklarında besiyerinde biriken NO miktarı Griess reaktifi kullanılarak analiz edildi. Şekil 4.26’da gösterilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak 540 nm dalga boyundaki optik dansite değerlerine göre NO miktarı μM cinsinden belirlendi.



Şekil 4.26: Standart nitrit kalibrasyon eğrisi.

Sadece besiyeri eklenen kontrol kuyucuklarda çok az miktarda NO salınırken, 1 µg/mL *E.coli* LPS ile indüklenmiş kuyucuklarda NO üretimi büyük ölçüde arttı. Uygulanan Propolis, Kuersetin ve nanoformülasyonlar (Propolis-PCL, Kuersetin-PCL) LPS ile indüklenmiş NO üretimini indirdi (Şekil 4.27). Kuersetin hariç tüm örneklerde 25; 50; 75 µg/mL konsantrasyonlardaki uygulamaların NO salımı üzerinde daha etkili olduğu belirlendi.



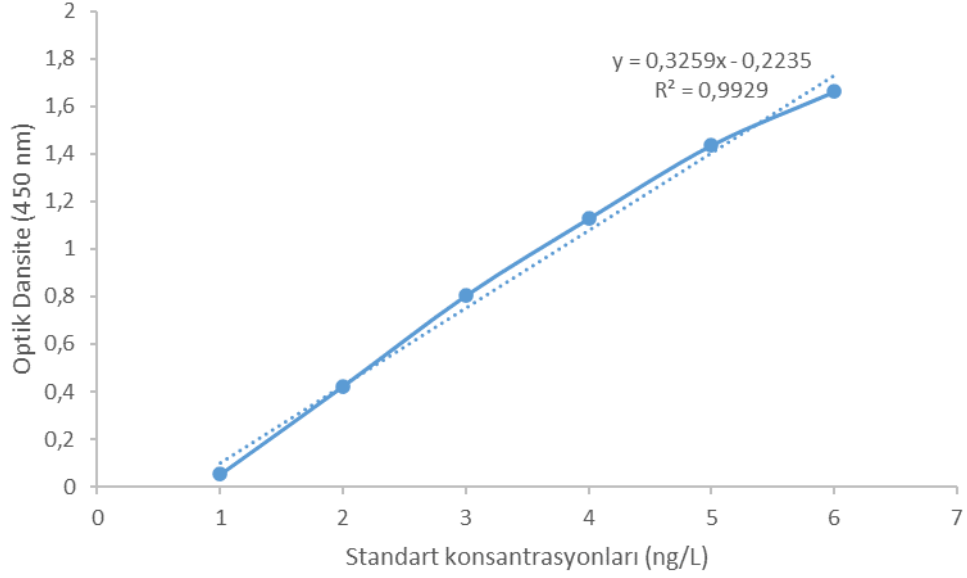
Şekil 4.27: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin LPS ile indüklenmiş makrofaj hücrelerinde NO salımı üzerine etkileri (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, LPS grupuna göre kıyaslama yapıldı; &P<0.05, &&P<0.01, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir).

4.6. PROPOLİS, KUERSETİN, PROPOLİS-PCL VE KUERSETİN-PCL UYGULANMIŞ LPS-İNDÜKLÜ J774 MAKROFAJ HÜCRELERİNDE IL-4, IFN-GAMA VE IL-1BETA DÜZEYLERİ

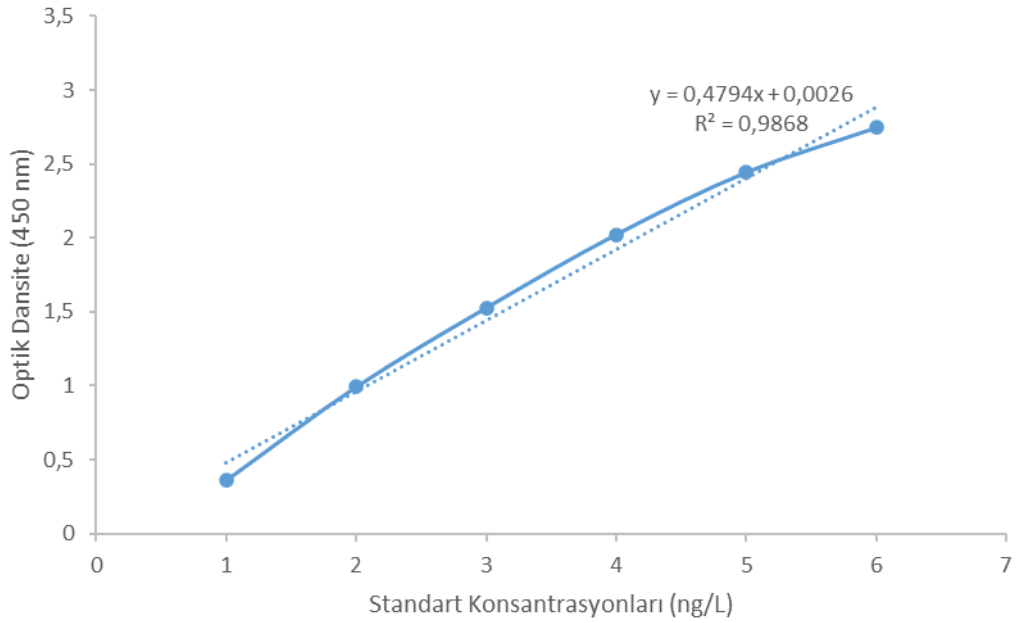
4.6.1. ELISA Standart Eğrileri

Hücre uygulamaları sonrasında, mikropalakaların kuyucuklarından toplanmış makrofaj hücrelerinin süpernatantlarına salgılanmış IL-4, IFN-γ ve IL-1β sitokinlerinin protein düzeylerini belirlemek için, önce ticari kit protokolüne göre standart eğriler hazırlandı. Sonuçlar

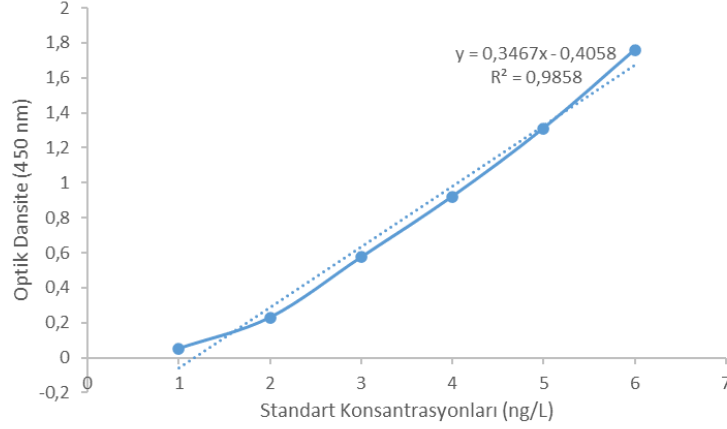
ng/mL olarak değerlendirildi. Hazırlanan standart eğriler Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’da verildi.



Şekil 4.28: IL-4 sitokininin ELISA ile analizi için hazırlanan standart eğri.



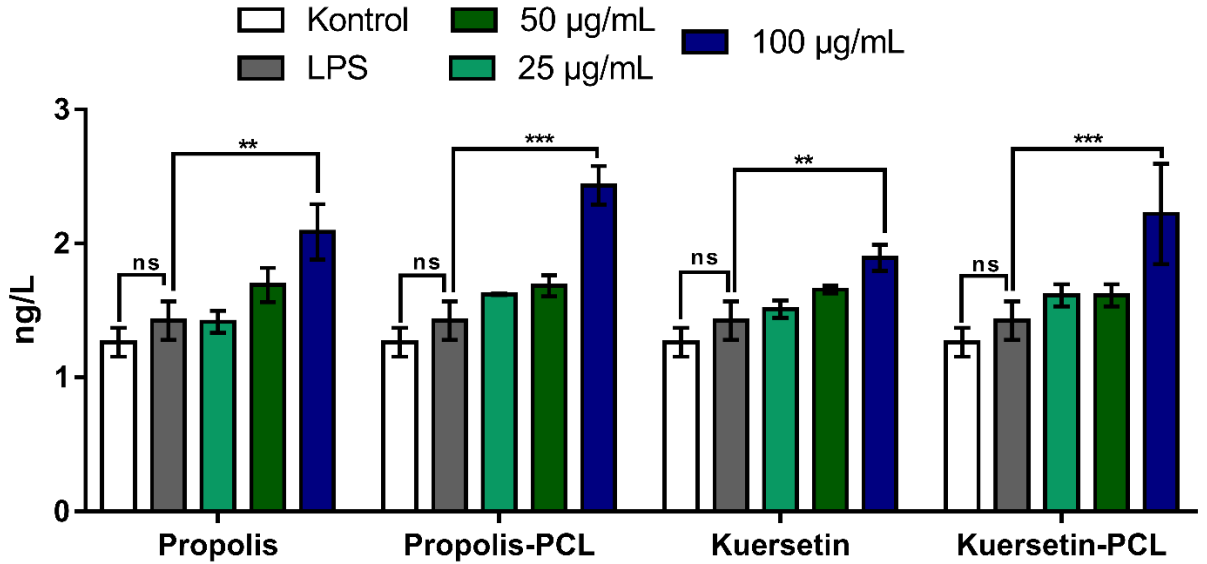
Şekil 4.29: IFN-γ sitokininin ELISA ile analizi için hazırlanan standart eğri.



Şekil 4.30: IL-1 β sitokininin ELISA ile analizi için hazırlanan standart eğri.

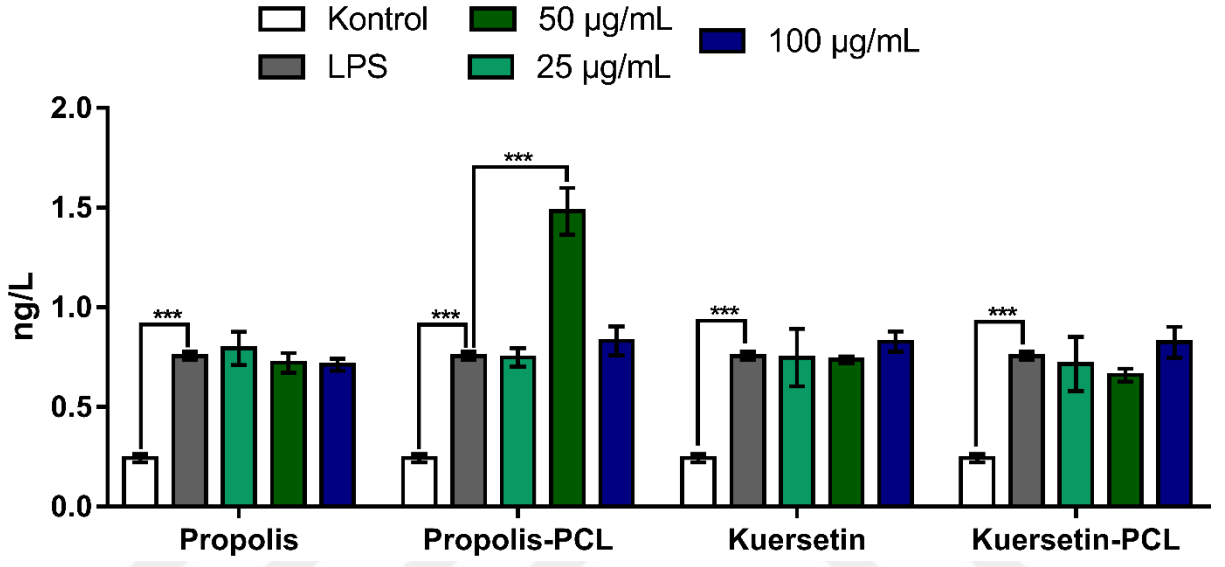
4.6.2. ELISA Sonuçları

Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda 48 saat süreyle uygulandığı LPS ile uyarılmış J774 makrofaj hücrelerinde IL-4 anti-enflamatuvar sitokininin düzeyinin artırdığı tespit edildi (Şekil 4.31). Sadece LPS uygulanmış kuyucuklardan toplanan hücre süpernatantlarında, IL-4 sitokin düzeyi, kontrol kuyucuklara göre az miktarda artışı olsa da, bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı saptandı.



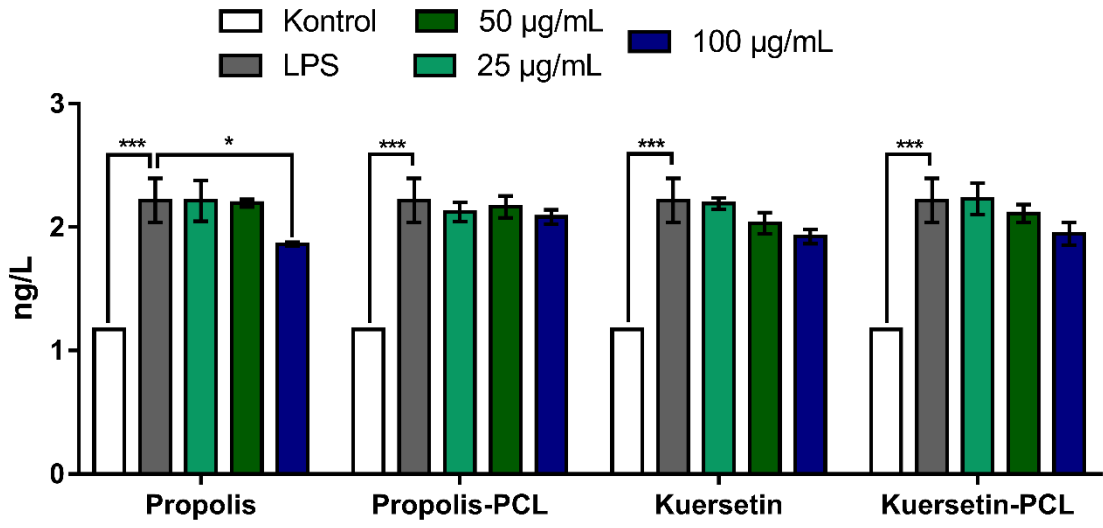
Şekil 4.31: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL uygulamalarının LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde IL-4 düzeylerine etkisi (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir; ns= "not significant", anlamlı değildir).

LPS'nin makrofaj hücrelerinde IFN- γ üretimini de önemli derecede indüklediği gözlemlendi (Şekil 4.32). Propolis, Kuersetin ve Kuersetin-PCL'nin bütün konsantrasyonlarının IFN- γ düzeyini etkilemediği, buna karşın Propolis-PCL nanopartikülünün 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunun IFN- γ üretimini büyük oranda (yaklaşık 2 kat) artırdığı gözlemlendi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL uygulamalarının LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde IFN- γ düzeylerine etkisi (***) $P < 0.001$, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir).

LPS'nin makrofaj hücrelerinde IL-1 β sitokini üretimini önemli derecede indüklediği gözlemlendi (Şekil 4.33). LPS grupuna kıyasla sadece 100 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda uygulanan Propolis'in bu sitokinin düzeyini düşürdüğü, diğer tüm örneklerin IL-1 β düzeyi üzerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı belirlendi (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL uygulamalarının LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde IL-1 β düzeylerine etkisi (*P<0.05, ***P<0.001, gruplararası kıyaslama yapıldı; dikey çubuklar standart sapmayı gösterir).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son yıllarda arı ürünleri geleneksel ve çağdaş tıpta geniş kullanım alanı bulmaktadır. Propolis gibi sağlık üzerine yararlı etkileri olan arı ürünleri fonksiyonel gıda olarak da nitelendirilebilir. Zengin içeriği ile, özellikle yapısındaki biyoaktif fenolik bileşikler sayesinde anti-bakteriyel, anti-enflamatuvar, anti-kanser, anti-oksidan gibi birçok özelliğe sahip propolis önemli bir ticari arı ürünüdür (Pasupuleti ve diğ., 2017).

Propolisten farklı yöntemlerle değişik biyoaktif bileşikler içeren çeşitli ekstraktlar hazırlanabilir ve sağlığa yararlı etkileri *in vitro* tekniklerle araştırılabilir. Örneğin, propolisin etanol ile hazırlanan, “balsam” veya “propolis tentürü” olarak isimlendirilen ekstresinin immünostimülatör, anti-enflamatuvar, hepatoprotektif ve anti-tümör (sitotoksik) özellikleri araştırılmıştır (De Groot, 2013).

Ekstrenin hazırlanma şekliinden bağımsız olarak, coğrafi ve bitkisel kaynağına ve toplanma zamanına göre propolis örneklerinin içeriği farklı olabilir (Arda, 2019). Polifenoller, aromatik asitler ve diterpenik asitler gibi bazı bileşikler propolisin biyolojik-farmakolojik aktivitelerinde önemli görevler almaktadır (Wagh, 2013). Bununla birlikte, propolisin içeriğinin zengin olması, her bileşiğin farklı bir aktivite göstereceği anlamına gelmez; birçok bileşik tek bir aktivite için sinerjik etki de gösterebilir (Boisard ve diğ., 2015).

Avrupa ve Asya'nın ortasında, farklı iklim kuşaklarında yer alan Türkiye, 4 deniz (Karadeniz, Marmara Denizi, Ege Denizi ve Akdeniz) ile çevrilmiştir ve 11.000'den çok infrajenerik taksonda yer alan bitkiyi içeren zengin bir bitki örtüsüne sahiptir. Türkiye'den toplanmış farklı propolis örneklerinin içerik analizlerinde çeşitli standartlara göre O-tip (karakavak bitkisel kökenli) propolisin hakim olduğu ve kuersetin, apigenin, krizin, kafeik asit, naringenin, CAPE, pinobanksin, galangin ve pinosembrin gibi fenolik bileşikler içerdiği tespit edilmiştir (Guzelmeric ve diğ., 2018). Analitik yöntemlerle yapılan başka araştırmalar da, Türkiye'den toplanan propolis örneklerinin fenolik içeriğinde kuersetin flavonoidinin varlığını kanıtlamıştır (Degirmencioglu ve diğ., 2019; Uzel ve diğ., 2005). Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden (bunlar arasında bu çalışmada kullanılan propolis örneğinin toplandığı Kırklareli de yer almaktadır) toplanmış farklı propolis örneklerinin LC-MS/MS yöntemi ile yapılan içerik analizlerinde, örneklerin %96'sında kuersetin flavonoidinin varlığı onaylanmıştır (Sorucu ve Oruç, 2019).

Propolisin içerdiği önemli fenolik bileşiklerden biri olan kuersetin flavonoidinin doğadaki kaynağı bitkilerdir. Kapalı formülü $C_{15}H_{10}O_7$ olan kuersetin flavonoidi ketakarbonil grubu içerir ve ilk karbon atomu ile bağlı oksijen bazik olduğu için, kuersetin kuvvetli asitler ile tuz oluşturabilir. Kimyasal yapısındaki fenolik hidroksil grubu ve çift bağlar sayesinde kuersetin güçlü anti-oksidan ve anti-enflamatuvar aktivite gösterir. Literatürdeki bilgiler, propolis ve kuersetin flavonoidinin benzer – anti-enflamatuvar, immünomodülatör, anti-tümör, anti-oksidan aktiviteler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Yang ve diğ., 2020a).

Kuersetin LPS ile uyarılmış makrofajlarda TNF- α 'nın (Ghosh, 1999), A549 akciğer hücrelerinde ise LPS ile indüklenmiş IL-8'in (Geraets ve diğ., 2007) anlatımını inhibe edebilmiştir. Ayrıca bu flavonoidin glia hücrelerinde IL-1 α ve TNF- α sitokinlerinin LPS ile indüklenmiş mRNA anlatımlarını baskıladığı bilinmektedir. Kuersetin, enflamasyonla ilişkili sikloksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerini de inhibe edebilme özelliği taşır (Yang ve diğ., 2020a).

Üç gün devam eden yorucu egzersiz ile insanda oluşabilecek enflamasyona karşı, iki hafta kuersetin flavonoidi ile epigallokateşin gallat'ın birlikte kullanımının koruyucu/tedavi edici etki gösterdiği, granülositlerdeki oksidatif patlama aktivitesini artırabileceği rapor edilmiştir (Nieman ve diğ., 2009). Kuersetin hücrel ve humoral bağışıklığı artırarak immünostimulan aktivite sergileyebilir (Jantan ve diğ., 2015).

Propolisin immün yanıt üzerine etkisine ilişkin yapılan çalışmalarda, daha çok bakteriyel LPS ile indüklenmiş farklı makrofaj hücreleri veya diğer hücre hatlarında NO, iNOS, COX enzimi ve bazı sitokinlerin (IL-1 α ; TNF- α ; IL-4; IL-10 vb.) protein düzeyleri ve gen anlatımları belirteç olarak seçilmiştir (Blonska ve diğ., 2004; Cardile ve diğ., 2003; Rossi ve diğ., 2002). Propolisin bitkisel ve coğrafi kaynağına, hazırlanma şekline ve uygulama dozlarına göre pro-enflamatuvar veya anti-enflamatuvar aktivite gösterebildiği ve immünomodülatör etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Conti ve diğ., 2015).

İmmün sistemin önemli parçaları olan sitokinler, çeşitli hücre tiplerini otokrin, parakrin veya endokrin yolla harekete geçirerek farklı immün fonksiyonları düzenleyebilir, aynı zamanda diğer sitokinlerle sinerjik etki göstererek, sitokin ağını oluşturabilir. Örneğin, IFN- γ hem doğal hem de kazanılmış immünitinin mediyatörlerindendir. Anti-enflamatuvar sitokinler grubunda sınıflandırılan IL-4, yardımcı T hücrelerinin Th2 hücrelerine dönüşümünü sağlar. Daha sonra

Th2 hücreleri sayesinde salgılanan IL-4 sitokini aktifleşmiş T ve B hücrelerinin proliferasyonuna yol açar. Ayrıca, IL-4 sitokini Th1 hücrelerindeki IFN- γ ve IL-12 sitokinlerinin üretimini azaltır, makrofajların M2 fenotipe farklılaşmasını sağlar (Ramani ve diğ., 2015).

Makrofaj hücreleri, bağışıklık sisteminin en önemli parçalarından biri olmaları, bu sistemin diğer önemli bileşikleri ve belirteçleri ile (sitokinler, NO, iNOS vb.) doğrudan veya dolaylı ilişkiler kurmaları, iki farklı fenotipe (M1, M2) dönüşebilmeleri gibi nedenlerle immün yanıt üzerine yapılan araştırmalarda geniş çapta kullanılmaktadır (Franken ve diğ., 2016).

Gram negatif bakterilerin dış membranlarından elde edilen lipopolisakkarit (LPS), monositlerde ve makrofajlarda immün yanıtı uyarmak için kullanılan bir indükleyicidir (Meng ve Lowell, 1997).

Çağdaş ilaç endüstrisinde etken maddelerin hedef bölgeye bozulmadan taşınması, kontrollü ilaç salımı ve dokuya kolay nüfuz etmesini sağlamak için nano ve mikro boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır (Martinho ve diğ., 2011; Jahangirian ve diğ., 2017). Propolisin güçlü yapışkan özelliği, keskin tadı ve az çözünürlüğü gibi istenmeyen özellikleri nedeniyle, ilaç taşıyıcı sistemlerde kapsüllenerek biyoyararlanımı daha yüksek ve tüketime daha uygun ürünler geliştirilebilir (Li ve diğ., 2012). Polikaprolakton (PCL) FDA tarafından onay almış non-toksik bir polimer olduğundan çeşitli etken maddelerin kapsüllemesinde kullanılmaktadır (Sinha ve diğ., 2004).

Literatüre dayanarak, çeşitli propolis örneklerinin, farklı aktiviteleri üzerine yapılmış çalışmalarda, PLGA, PF-108, zein/kazeinat/alginat gibi ilaç taşıyıcı sistemler kullanıldığı söylenebilir (Do Nascimento ve diğ., 2016). Çeşitli propolis formülasyonlarının hazırlanmasında PCL polimerinin kullanımı, literatürde ya mikro-boyutta kapsülleme, ya da diğer sistemlerle (Jelatin, Poliüretan) kompleks şeklinde kapsülleme olarak karşımıza çıkmaktadır (Duran ve diğ., 2007; Eskandarinia ve diğ., 2020). Literatürde sadece PCL (poly- ϵ -caprolactone) polimeri ile nano boyutta kapsüllemiş propolis ve bu nanoformların immün yanıtındaki rolüne ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin Marmara Bölgesinden (Kırklareli-Kıyıköy) toplanmış propolisten hazırlanan etanolik ekstre, PCL polimeri kullanılarak nano boyutta ilk kez kapsüllemiş ve

ekstre ile içeriğindeki temel flavonoidlerden biri olan kuersetinin hem ham, hem de enkapsüle nanoformlarının immün yanıt üzerine etkisi ilk kez araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında propolisten balmumu ve diğer istenmeyen bileşikleri içermeyen, kapsüllenme ve hücre uygulamalarına uygun etanolik bir ekstre hazırlanmıştır. Başlangıç maddesi 50 g ham propolisten 4 g etanolik ekstre elde edilmiştir.

Daha sonra ikili emülsiyon (y/s/y) çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılarak Propolis (ekstresi) ve ticari olarak temin edilmiş Kuersetin flavonoidi PCL polimeri ile kapsüllenmiştir.

Üçüncü aşamada hazırlanan nanopartiküllerin farklı analizlerle karakterizasyonu yapılmıştır. ZetaSizer analizleri sonucunda Propolis-PCL nanopartikülünün -15.4 mV Zeta Potansiyeline sahip olduğu ve boyutunun 280-286 nm olduğu; Kuersetin-PCL nanopartikülünün ise -18.9 mV Zeta Potansiyeline sahip olduğu ve boyutunun 177-187 nm olduğu tespit edilmiştir. Negatif zeta potansiyeli değerleri, nanopartiküllerin yüzeyindeki polikaprolakton kısımlarına ait iyonize karboksil grupları ile ilişkilidir (Rabha ve diğ., 2021). Eksi zeta potansiyel değeri nanopartiküllerin kararlı olduğunun ve daha az agregasyon eğilimi gösterdiğinin güvenilir bir göstergesidir (Kumari ve diğ., 2010). Nanopartiküllerin boyutu terapötik ilaçların-etken maddelerin taşınmasını ve nanoformülasyonların hücreler tarafından emilimini önemli şekilde etkilemektedir. 300 nm'den daha küçük boyutta olan nanopartiküller insan vücudunda daha kolay taşınabilir (Ghosh ve diğ., 2016; Zauner ve diğ., 2001). Bu bilgiye dayanarak elde ettiğimiz nanopartiküllerin uygun boyutta olduğu anlaşılmaktadır.

Nano boyutlu taşıyıcı sistemler için, özellikle polimerik nanopartiküller için 0.2'den küçük PDI değerleri uygun görülmektedir (Danaei ve diğ., 2018). Bu çalışmada hazırlanan her iki nanopartikülün (PDI) değerleri 0.1'den küçük bulunmuştur. Bu değerler her iki nanopartikülün monodispers olduğunun iyi bir göstergesidir.

FTIR analizi sayesinde propolisin ve kuersetin flavonoidinin PCL polimerinde kapsüllendiği onaylanmış ve bu ölçüm ZetaSizer analizlerinin sonuçlarını kanıtlamıştır. PCL için karakteristik olan, karbonil (C=O) grubu ile ilişkili poliester bandı 1700 cm^{-1} 'de belirlenmiştir (Leimann ve diğ., 2015). Propolis ekstresi için spektrumda özellikle aromatik bileşiklerle ilgili dalgalanmalar belirgin şekilde ortaya çıkar. $1400\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ aralığında C=C bağlarına ait dalgalanma mevcuttur (El-Guendouz ve diğ., 2016).

Taramalı elektron mikroskobu ile Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL nanopartiküllerinin kürecik şeklinde olduğu izlenmiş ve hidrodinamik çaplarının Zetasizer boyut ölçümlerinden çok az büyük (Propolis-PCL 280-350 nm; Kuersetin-PCL 200-260 nm) olduğu görülmüştür. Propolis nanoformülasyonlarının sulu ortamda hidrofobik bağlar oluşturabilmesi, boyut ölçümlerinde hidrodinamik çapın gerçek partikül boyutundan büyük değerler sergilemesi ile sonuçlanabilir (Barbosa ve diğ., 2019).

Her iki nanoformülasyonun XRD analizinde $2\theta = 21-24^\circ$ Bragg açılarında iki sert kırınım piki görülmüştür ve nanopartiküllerin kristalin yapısının amorf (polietilen benzeri) olduğu tespit edilmiştir (Natarajan ve diğ., 2011).

Propolis-PCL nanopartikülünün Etkin Yükleme Kapasitesi %75, Reaksiyon Verimi %63, Enkapsülasyon Etkinliği ise %83 olarak bulunmuştur. Kuersetin-PCL nanopartikülü için, aynı değerler %68, %51 ve %76 olmuştur.

Propolis-PCL nanopartikülü 72 saat, Kuersetin-PCL nanopartikülü ise 96 saat sonra %60'ın üzerinde etken madde salımı gerçekleştirmiştir.

Çalışmanın son aşamasında Propolis, Kuersetin, Propolis-PCL ve Kuersetin-PCL'nin LPS ile uyarılmış J774 makrofaj hücrelerinde NO salımı ve bazı sitokinlerin düzeyi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. LPS-indüklü hücelere 48 saat süreyle uygulanan tüm örnekler belli konsantrasyonlarda NO salımını inhibe etmiştir. Nanopartiküllerin inhibitör etkisi ham etken maddelere göre daha yüksek bulunmuştur. Literatürde propolis ve kuersetin ile bunlardan hazırlanmış nanopartiküllerin NO salımını inhibe etme kapasitesine ilişkin sınırlı sayıda yayına rastlanmıştır. Örneğin, Propolisin NO salımını inhibe ettiği Medjeber ve diğ. (2018) tarafından rapor edilmiştir. Propolisin yanı sıra kuersetinin de NO salımını önemli ölçüde durdurduğu Blonska ve diğ. (2004) tarafından bildirilmiştir. Propolis ekstresi ve kuersetinin NO üretimi üzerindeki inhibitör etkisini belirten diğer çalışmalar da (Valenzuela-Barra ve diğ., 2015; Cardile ve diğ., 2003) bizim bulgularımızı desteklemektedir.

LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerine 48 saat süreyle 100 µg/mL konsantrasyonda uygulanan tüm örnekler IL-4 anti-enflamatuvar sitokininin düzeyini büyük ölçüde artırmıştır. Nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerde IL-4 düzeyi Propolis ve Kuersetin uygulanan hücrelerdekinden daha yüksektir. Literatürde Propolisin IL-4 ile aynı grupta bulunan anti-

enflamatuvar sitokinlerin üretimini artırdığını rapor eden çalışmalara rastlanmıştır (Conti ve diğ., 2015; Medjeber ve diğ., 2018).

Bu çalışmada sadece 100 µg/mL konsantrasyonda uygulanmış Propolis örneğinin (etanolik ekstresinin) LPS ile indüklenmiş makrofaj hücrelerinde IL-1β düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir. Diğer örneklerin bu sitokin düzeyi üzerinde etkisi olmadığı bulunmuştur. Literatürde bizim bulgularımızı destekleyen, yani Propolisin LPS ile uyarılmış makrofaj hücrelerinde, IL-1β düzeyini düşürdüğünü rapor eden başka araştırmalar da bulunmaktadır (Xiong ve diğ., 2019; Bueno-Silva ve diğ., 2015; Blonska ve diğ., 2004, Okoko ve Oruambo, 2009).

Propolis-PCL nanopartikülü 50 µg/mL konsantrasyonda iken, LPS ile uyarılmış J774 makrofaj hücrelerinde IFN-γ düzeyini büyük oranda artırmıştır. Diğer örneklerin IFN-γ düzeyi üzerinde etkisi gözlenmemiştir. Propolisin IFN-γ sitokini üzerine etkisi ile ilgili önceki çalışmaların çoğunda hem indükleyici aktivitesi (Sa Nunes ve diğ., 2002), hem de inhibitör aktivitesi (Fatahinia ve diğ., 2012) rapor edilmiştir. Bununla birlikte, Conti ve diğ. (2015) çeşitli propolis örneklerinin farklı içeriğe sahip olması veya diğer hücrel mediyatörlerin devreye girmesi nedeniyle propolisin hem anti-enflamatuvar, hem de pro-enflamatuvar etki gösterebileceğini bildirmektedir. Literatürdeki bu çalışmalar propolisin IFN-γ düzeyini artırarak immünomodülatör etki gösterdiğini ileri sürmektedir. Bu çalışmada Propolisin sadece nanopartikül formundayken IFN-γ düzeyini artırması, bu etkiyi 50 µg/mL konsantrasyonda yaparken, daha yüksek konsantrasyonda göstermemesi pro- ve anti-enflamatuvar etkisinin hücreler tarafından absorplanma oranına ve dozuna göre değişebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, yerli bir ticari propolisten hazırlanmış etanolik ekstre ilk kez bu çalışmada polikaprolakton polimeri (PCL) ile nano boyutta kapsüllenmiş, immün yanıtla ilişkili bazı sitokinlerin düzeyleri ve NO salımı üzerine etkisi araştırılmıştır. Propolisin içerdiği kuersetin flavonoidi ile de aynı işlemler gerçekleştirilerek, sonuçlar karşılıklı olarak kıyaslanmıştır. Çalışma kapsamında propolisin hem anti-enflamatuvar, hem de pro-enflamatuvar aktivite gösterebileceği ortaya konulmuştur. Bu tezde elde edilen veriler ileride, biyoyararlanımı daha yüksek, immünomodülatör özellikli yeni propolis ürünlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Alencar, S., Oldoni, T., Castro, M., Cabral, I., Costa-Neto, C., Cury, J., Rosalen, P., Ikegaki, M., 2007, Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of ethnopharmacology*, 113, 278–283.
- Al Ghamdi, A.A., Badr, G., Hozzein, W.N., Allam, A., Al-Waili, N.S., Al-Wadaan, M.A., Garraud, O., 2015, Oral supplementation of diabetic mice with propolis restores the proliferation capacity and chemotaxis of B and T lymphocytes towards CCL21 and CXCL12 by modulating the lipid profile, the pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress. *BMC immunology*, 16(1), 1-14.
- Alimoradi, H., Greish, K., Gamble, A.B., Giles, G. I., 2019, Controlled delivery of nitric oxide for cancer therapy. *Pharmaceutical nanotechnology*, 7(4), 279-303.
- Allahverdiyev, A.M., Kon, K.V., Abamor, E.S., Bagirova, M., Rafailovich, M., 2011, Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(11), 1035-1052.
- Amgoth, C., Phan, C., Banavoth, M., Rompivalasa, S., Tang, G., 2019, *Polymer properties: Functionalization and surface modified nanoparticles*, Role of novel drug delivery vehicles in nanobiomedicine, In: Tyagi, R. (ed.), IntechOpen, London, UK, ISBN: 978-1-78923-986-7.
- Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., Trinajstic, N., 2007, SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 14(7), 827-845.
- Anselmo, A.C., ve Mitragotri, S., 2015, A review of clinical translation of inorganic nanoparticles. *The AAPS journal*, 17(5), 1041-1054.
- Arango Duque, G., Descoteaux, A., 2014, Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 5, 491.
- Arda, N., 2019, Effects of extraction conditions on the antioxidant capacities of honey, bee pollen and propolis extracts, 2nd International Congress on Traditional and Complementary Medicine 24-27 April 2019, Abstract Book, Poster, pp. 361-362.
- Bangham, A. D., 1993, Liposomes: the Babraham connection. *Chemistry and physics of lipids*, 64(1-3), 275-285.
- Bankova, V., 2005, Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.
- Bankova, V.S., de Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000, Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.

- Barbosa, V.T., Souza, J.K., Alvino, V., Meneghetti, M.R., Florez-Rodriguez, P.P., Moreira, R. E., Paulino, G.V.B., Landell, M.F., Basilio-Junior, I.D., Do Nascimento, T.G., Grillo, L.A.M., Dornelas, C.B., 2019, Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. *Biotechnology progress*, 35(6), e2888.
- Batista, L.L.V., Campesatto, E.A., Assis, M.L.B.d., Barbosa, A.P.F., Grillo, L.A.M., Dornelas, C.B., 2012, Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Revista do colegio. brasileiro. Cir.*, 39, 515–520.
- Benoit, M., Desnues, B., Mege, J.L., 2008, Macrophage polarization in bacterial infections. *The journal of immunology*, 181(6), 3733-3739.
- Berretta, A.A., Silveira, M.A.D., Capcha, J.M.C., De Jong, D., 2020, Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 110622.
- Beutler, B.A., 1999, The role of tumor necrosis factor in health and disease. *The journal of rheumatology*. Supplement, 57, 16-21.
- Beutler, B.A., 2009, TLRs and innate immunity. *Blood, The journal of the american society of hematology*, 113(7), 1399-1407.
- Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R., Kaul, S.C., 2021, *Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. nutrients*, 13(8), 2528.
- Bianchi, M.E., 2007, DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, 81(1), 1-5.
- Bischoff, S. C., 2008, Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 11(6), 733–740.
- Biswas, S. K., Mantovani, A., 2010, Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*, 11(10), 889-896.
- Blonska, M., Bronikowska, J., Pietsz, G., Czuba, Z. P., Scheller, S., Krol, W., 2004, Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A. 1 macrophages. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 25-30.
- Bogdan, C., 2001, Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*, 2(10), 907-916.
- Boisard, S., Le Ray, A.M., Landreau, A., Kempf, M., Cassisa, V., Flurin, C., Richomme, P., 2015, Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015.
- Borjigin, M., Eskridge, C., Niamat, R., Strouse, B., Bialk, P., Kmiec, E. B., 2013, Electrospun fiber membranes enable proliferation of genetically modified cells. *International journal of nanomedicine*, 8, 855.
- Bozzuto, G., Molinari, A., 2015, Liposomes as nanomedical devices. *International journal of nanomedicine*, 10, 975.

- Braakhuis A., 2019, Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*, 11(11), 2705.
- Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C., 2015, Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annual review of immunology*, 33, 257-290.
- Bueno-Silva, B., Kawamoto, D., Ando-Suguimoto, E.S., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., Mayer, M.P., 2015, Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in LPS-activated macrophages. *Plos one*, 10(12):e0144954.
- Bufalo, M.C., Sforcin, J.M., 2015, The modulatory effects of caffeic acid on human monocytes and its involvement in propolis action. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 67(5), 740-745.
- Burdock, G.A., 1998, Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and chemical toxicology*, 36:347-63.
- Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Rosado Perez, A., 2008, GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56, 9927–9932.
- Cao, Y., Wang, Y., Yuan, Q., 2004, Analysis of flavonoids and phenolic acid in propolis by capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 59, 135–140.
- Cardile, V., Panico, A., Gentile, B., Borrelli, F., Russo, A., 2003, Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life sciences*, 73(8), 1027-1035.
- Castaldo, S., Capasso, F., 2002, Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.
- Castellano, G., Gonzalez-Santander, J.L., Lara, A., Torrens, F., 2013, Classification of flavonoid compounds by using entropy of information theory. *Phytochemistry*, 93, 182-191.
- Chaplin, D.D., 2010, Overview of the immune response. *Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2), S3-S23.
- Chawla, J.S., Amiji, M.M., 2002, Biodegradable poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen. *International journal of pharmaceutics*, 249(1-2), 127-138.
- Cigut, T., Polak, T., Gasperlin, L., Raspor, P., Jamnik, P., 2011, Antioxidative activity of propolis extract in yeast cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(21), 11449-11455.
- Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Boyd, J.G., Moser, B., Wood, D.E., Sahagan, B.G., Neote, K., 1998, Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel Non-ELR CXC Chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *The journal of experimental medicine*, 187(12), 2009-2021.

- Coleman, J.W., 2001, Nitric oxide in immunity and inflammation. *International immunopharmacology*, 1(8), 1397-1406.
- Conti, B.J., Santiago, K.B., Bufalo, M.C., Herrera, Y.F., Alday, E., Velazquez, C., Hernandez, J., Sforcin, J. M., 2015, Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 67(10), 1431-1438.
- Cortajarena, A.L., Ortega, D., Ocampo, S.M., Gonzalez-García, A., Couleaud, P., Miranda, R., Belda-Iniesta C., Ayuso-Sacido, A., 2014, Engineering iron oxide nanoparticles for clinical settings. *Nanobiomedicine*, 1-2.
- Crucho, C.I.C., Barros, M.T., 2017, Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials science & engineering:C*, S0928-4931(17)32163-X.
- Cunha, I., Sawaya, A.C., Caetano, F.M., Shimizu, M.T., Marcucci, M.C., Drezza, F.T., Povia, G.S., Carvalho, P. D. O., 2004, Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *Journal of the brazilian chemical society*, 15, 964-970.
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M. R., 2018, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- Danert, F.C., Zampini, C., Ordonez, R., Maldonado, L., Bedascarrasbure, E., Isla, M. I., 2014, Nutritional and functional properties of aqueous and hydroalcoholic extracts from Argentinean propolis. *Natural product communications*, 9(2), 1934578X1400900209.
- Da Silva Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S., Padilha F.F., Seixas F.K., Collares T., Borsuk S., Dellagostin O.A., Henriques J.A.P., Roesch-Ely, M., 2013, Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and chemical toxicology*, 52, 137-142.
- Daubney, J., Bonner, P.L., Hargreaves, A.J., Dickenson, J.M., 2015, Cardioprotective and cardiotoxic effects of quercetin and two of its in vivo metabolites on differentiated H9C2 cardiomyocytes. *Basic clinical pharmacology and toxicology*, 116: 96-109.
- David, A.V.A., Arulmoli, R., Parasuraman, S., 2016, Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacognosy reviews*, 10(20), 84.
- Davies, L.C., Jenkins S.J., 2013, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nature immunology*, 14, 986-95.
- Degirmencioglu, H.T., Güzelmeriç, E., Yuksel, P.I., Kırmızıbekmez, H., Deniz, I., Yesilada, E., 2019, A new type of Anatolian propolis: Evaluation of its chemical composition, activity profile and botanical origin. *Chemistry & biodiversity*, 16(12):e1900492.
- De Groot, A.C., 2013, Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24(6), 263-282.

- De Melo Silva, S.I., Gaspar, L.M.A., Rocha, A.M.O., Costa, L.P., Tada, D.B., Franceschi, E., Padilha, F.F., 2020, Encapsulation of Red Propolis in Polymer Nanoparticles for the Destruction of Pathogenic Biofilms. *AAPS PharmSciTech*, 21(2), 1-9.
- Devequi-Nunes, D., Machado, B.A.S., Barreto, G.D.A., Reboucas Silva, J., da Silva, D.F., da Rocha, J.L.C., Brandao, H.N., Borges, V.M., Umsza-Guez, M.A., 2018, Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *Plos one*, 13(12), e0207676.
- De Villiers, M.M., Aramwit, P., Kwon, G.S., 2008, Nanotechnology in drug delivery. *Springer science & business media*.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nikolov, N., Popov, S., 1991, Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infections protection and macrophage function. *Apidologie*, 22, 155–162.
- Dinarello, C.A., 2018, Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*, 281(1), 8-27.
- Do Nascimento, T.G., Da Silva, P.F., Azevedo, L.F., Da Rocha, L.G., de Moraes Porto, I.C.C., e Moura, T.F.A.L., Basílio-Júnior, I.D., Grillo, L.A.M., Dornelas, C.B., Fonseca, E.J.S., Oliveira, J.E., Zhang, A.T., Watson, D.G., 2016, Polymeric Nanoparticles of Brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity. *Nanoscale research letters*, 11(1), 1-16.
- Duran, N., Marcato, P.D., Buffo, C.M.S., De Azevedo, M.M.M., Esposito, E., 2007, Poly (ϵ -caprolactone)/propolis extract: microencapsulation and antibacterial activity evaluation. *Die pharmazie-an international journal of pharmaceutical sciences*, 62(4), 287-290.
- Elbaz, N.M., Khalil, I.A., Abd-Rabou, A A., El-Sherbiny, I.M., 2016, Chitosan-based nano-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. *International journal of biological macromolecules*, 92, 254-269.
- El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Bankova, V., Lourenço, J. P., Costa, A.M.R., Mariano, J.F., Miguel, M.G., Faleiro, M.L., 2016, Impact of biohybrid magnetite nanoparticles and moroccan propolis on adherence of methicillin resistant strains of staphylococcus aureus. *Molecules*, 21(9), 1208.
- Ertürküner, S. P., Saraç, E. Y., Göçmez, S. S., Ekmekçi, H., Öztürk, Z. B., Seçkin, İ., Sever, Ö., Keskinbora, K., 2016, Anti-inflammatory and ultrastructural effects of Turkish propolis in a rat model of endotoxin-induced uveitis. *Folia histochemica et cytobiologica*, 54(1), 49-57.
- Eskandarinia, A., Kefayat, A., Agheb, M., Rafienia, M., Baghbadorani, M.A., Navid, S., Ebrahimpour, K., Khodabakhshi, D., Ghahremani, F., 2020, A novel bilayer wound dressing composed of a dense polyurethane/propolis membrane and a biodegradable polycaprolactone/gelatin nanofibrous scaffold. *Scientific reports*, 10(1), 1-15.

- Falcao, S.I., Vale, N., Gomes, P., Domingues, M.R., Freire, C., Cardoso, S.M., Vilas-Boas, M., 2013, Phenolic profiling of Portuguese propolis by LC–MS spectrometry: Uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochemical analysis*, 24(4), 309-318.
- Fatahinia, M., Khosravi, A. R., & Shokri, H., 2012, Propolis efficacy on TNF- α , IFN- γ and IL2 cytokines production in old mice with and without systemic candidiasis. *Journal de mycologie médicale*, 22(3), 237-242.
- Fokt, H., Pereira, A., Ferreira, A.M., Cunha, A., Aguiar, C., 2010, How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 1, 481-493.
- Franken, L., Marzena, S., Christian, K., 2016, Macrophages: sentinels and regulators of the immune system. *Cellular microbiology*, 18.4: 475-487.
- Friedl, J., Puhlmann, M., Bartlett, D.L., Libutti, S.K., Turner, E.N., Gnant, M.F., Alexander, H. R., 2002, Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor–dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF. *Blood, The Journal of the american society of hematology*, 100(4), 1334-1339.
- Fritz, J.H., Ferrero, R.L., Philpott, D.J., Girardin, S.E., 2006, Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature immunology*, 7(12), 1250-1257.
- Funari, C.S., Sutton, A.T., Carneiro, R.L., Fraige, K., Cavaleiro, A.J., da Silva Bolzani, V., Hilder, E.F., Arrua, R. D., 2019, Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. *Food research international*, 125, 108559.
- Galeotti, F., Maccari, F., Fachini, A., Volpi, N., 2018, Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods*, 7(3), 41.
- Gao, X., Wang, B., Wei, X., Men, K., Zheng, F., Zhou, Y., Zheng, Y., Gou, M.L., Huang, M., Guo, G., Huang, N., Qian, Z.Y., Wei, Y., 2012, Anticancer effect and mechanism of polymer micelle-encapsulated quercetin on ovarian cancer. *Nanoscale*, 4(22), 7021-7030.
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., Mantovani, A., 2013, The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*, 39(6), 1003-1018.
- Geraets, L., Moonen, H.J., Brauers, K., Wouters, E.F., Bast, A., Hageman, G.J., 2007, Dietary flavones and flavonoles are inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase-1 in pulmonary epithelial cells. *The journal of nutrition*, 137(10), 2190-2195.
- Ghosh, P., Bag, S., Roy, A. S., Subramani, E., Chaudhury, K., Dasgupta, S., 2016, Solubility enhancement of morin and epicatechin through encapsulation in an albumin based nanoparticulate system and their anticancer activity against the MDA-MB-468 breast cancer cell line. *RSC advances*, 6(103), 101415-101429.

- Ghosh, B., 1999, Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. *International journal of immunopharmacology*, 21(7), 435-443.
- Gordon, S., Crocker, P.R., Morris, L., Lee, S.H., Perry, V.H., Hume, D.A., 1986, *Localization and function of tissue macrophages*, Biochemistry of macrophages, In: Evered, D. (ed.), Chapter 5, Ciba Foundation Symposium, (118) 54-67.
- Graefe, E.U., Wittig J., Mueller, S., Riethling, A.K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H., Veit, M., 2001, Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *The Journal of clinical pharmacology*; 41:492–499.
- Guzelmeric, E., Ristivojević, P., Trifković, J., Dastan, T., Yilmaz, O., Cengiz, O., Yesilada, E., 2018, Authentication of Turkish propolis through HPTLC fingerprints combined with multivariate analysis and palynological data and their comparative antioxidant activity. *LWT*, 87, 23-32.
- Hausen, B.M., Wollenweber, E., Senff, H., Post, B., 1987, Propolis allergy. (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact dermatitis*, 17(3):171–177.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., 2001, The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410: 1–5.
- Hegazi, A.G., Abd El Hady, F.K., 2002, Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Zeitschrift für naturforschung C*, 57(3-4), 395-402.
- Helfenberg, K.D., 1908, The analysis of beeswax and propolis. *Chemiker zeitungm*, vol. 31, pp. 987–998.
- Hua, S., 2015, Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Frontiers in pharmacology*, 6, 219.
- Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.L., 2014, Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Inui, S., Shimamura, Y., Masuda, S., Shirafuji, K., Moli, R.T., Kumazawa, S., 2012, A new prenylflavonoid isolated from propolis collected in the Solomon Islands. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(5), 1038-1040.
- Italiani, P., Boraschi, D., 2014, From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in immunology*, 5, 514.
- Izuta, H., Shimazawa, M., Tsuruma, K., Araki, Y., Mishima, S., Hara, H., 2009, Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC complementary and alternative medicine*, 9(1), 1-10.

- Jahangirian, H., Lemraski, E. G., Webster, T. J., Rafiee-Moghaddam, R., Abdollahi, Y., 2017, A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. *International journal of nanomedicine*, 12, 2957.
- Janeway, C.A., 1989, Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Vol. 54, pp. 1-13, *Cold spring harbor laboratory press*.
- Jantan, I., Ahmad, W., Bukhari, S.N.A., 2015, Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in plant science*, 6, 655.
- Jawahar, N., Meyyanathan, S.N., 2012, Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review. *International journal of health & allied sciences*, 1(4), 217.
- Johannesson, G., Stefansson, E., Loftsson, T., 2016, Microspheres and nanotechnology for drug delivery. *Retinal pharmacotherapeutics*, 55, 93-103.
- Joncker, N.T., Raulet, D.H., 2008, Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells. *Immunological reviews*, 224(1), 85-97.
- Katircioglu, H., Mercan, N., 2006, Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. *African journal of biotechnology*, 5(11).
- Kaur, B. P., Secord, E., 2019, Innate immunity. *Pediatric clinics*, 66(5), 905-911.
- Kelly, G.S., 2011, Quercetin. Monograph, *Alternative medicine review*. 16, 172–194.
- Keskin, S., 2020, Orange peel volatile oil: A green solvent for propolis extraction, enhanced α -amylase inhibition activity. *Flavour and fragrance journal*, 35(4), 411-416.
- Khoshnevisan, K., Maleki, H., Samadian, H., Doostan, M., Khorramizadeh, M. R., 2019, Antibacterial and antioxidant assessment of cellulose acetate/polycaprolactone nanofibrous mats impregnated with propolis. *International journal of biological macromolecules*, 140, 1260-1268.
- Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy T.L., Murphy, K. M., 2009, Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature*, 457(7227), 318-321.
- Kubiliene, L., Laugaliene, V., Pavilonis, A., Maruska, A., Majiene, D., Barauskaite, K., Kubilius, R., Kasparaviciene, G., Savickas, A., 2015, Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1-7.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.

- Kulevanova, S., Stafilov, T., Dorevski, K., 1995, Determination of some macroelements in propolis by atomic absorption spectrometry. *Acta pharmaceutica (Zagreb)*, 45(1), 45-52.
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004, Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food chemistry*, 84(3), 329-339.
- Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W., 2013, Historical aspects of propolis research in modern times, *Evidence-based complementary alternative medicine*, 2013: 964149.
- Lee, G.H., Lee, S.J., Jeong, S.W., Kim, H.C., Park, G.Y., Lee, S.G., Choi, J.H., 2016a, Antioxidative and antiinflammatory activities of quercetin-loaded silica nanoparticles. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 143:511-517.
- Lee, J., Choi, J.W., Sohng, J.K., Pandey, R.P., Park, Y.I., 2016b, The immunostimulating activity of quercetin 3-O-xyloside in murine macrophages via activation of the ASK1/MAPK/NF- κ B signaling pathway. *International immunopharmacology*, 31, 88-97.
- Lee, Y.J. ve Park, Y., 2020, Green synthetic nanoarchitectonics of gold and silver nanoparticles prepared using quercetin and their cytotoxicity and catalytic applications. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 20(5), 2781-2790.
- Leimann, F.V., Biz, M.H., Kaufmann, K.C., Maia, W.J., Honcalves, O.H., Cardozo, L., Sayer, C., Araújo, P.H.H.D, 2015, Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles. *Ciencia rural*, 45, 2082-2088.
- Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintac, D., Majkic, T., Bekvalac, K., Orcic D., Mimica-Dukic, N., 2018, Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. *Journal of functional foods*, 40, 68-75.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Esumi, H., Kadota, S., 2010, Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *journal of natural products*, 73, 623–627.
- Li, F., Awale, S., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008, Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16, 5434–5440.
- Li, Y., Chen, M., Xuan, H., Hu, F., 2012, Effects of encapsulated propolis on blood glycemic control, lipid metabolism, and insulin resistance in type 2 diabetes mellitus rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 981896, 1–8.
- Li, Y.Q., Zhou, F.C., Gao, F., Bian, J.S., Shan, F., 2009, Comparative evaluation of quercetin, isoquercetin and rutin as inhibitors of α -glucosidase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(24), 11463-11468.

- Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S., 2008, LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151.
- Madunic, J., Madunic, I. V., Gajski, G., Popic, J., Garaj-Vrhovac, V., 2018, Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer letters*, 413, 11-22.
- Manjeet, K.R., Ghosh, B., 1999, Quercetin inhibits LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in murine macrophages. *International journal of immunopharmacology*, 21.7: 435-443.
- Martinez, G., Mijares, M.R., De Sanctis, J.B., 2019, Effects of flavonoids and Its Derivatives on Immune Cell Responses. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 13.
- Martinho, N., Damge, C., Reis, C. P., 2011, Recent advances in drug delivery systems. *Journal of biomaterials and nanobiotechnology*, 2(05), 510.
- Mc Carthy, D.J., Malhotra, M., O'Mahony, A.M., Cryan, J.F., O'Driscoll, C.M., 2015, Nanoparticles and the blood-brain barrier: advancing from in-vitro models towards therapeutic significance. *Pharmaceutical research*, 32(4), 1161-1185.
- Mc Carthy, J. R., Weissleder, R., 2008, Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), 1241-1251.
- Mc Namara, K., Tofail, S.A., 2015, Nanosystems: the use of nanoalloys, metallic, bimetallic, and magnetic nanoparticles in biomedical applications. *Physical chemistry chemical physics*, 17(42), 27981-27995.
- Medjeber, O., Touri, K., Rafa, H., Djeraba, Z., Belkhelfa, M., Boutaleb, A.F., Arroul-Lammali A., Belguendouz H., Touil-Boukoffa, C., 2018, Ex vivo immunomodulatory effect of ethanolic extract of propolis during Celiac Disease: involvement of nitric oxide pathway. *Inflammopharmacology*, 26(6), 1469-1481.
- Mello, B.C., Petrus, J.C.C., Hubinger, M.D., 2010, Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *Journal of food engineering*, 96(4), 533-539.
- Meng, F., Lowell, C.A., 1997, Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *Journal of experimental medicine*, 185.9: 1661-1670.
- Min, Y., Caster, J.M., Eblan, M. J., Wang, A.Z., 2015, Clinical translation of nanomedicine. *Chemical reviews*, 115(19), 11147-11190.
- Miyata, K., Christie, R.J., Kataoka, K., 2011, Polymeric micelles for nano-scale drug delivery. *Reactive and functional polymers*, 71(3), 227-234.
- Mohanraj, V.J., Chen, Y., 2006, Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.

- Moncada, S., Higgs, A., 1993, The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England journal of medicine*, 329(27), 2002-2012.
- Moreno, M.I., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2000, Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of ethnopharmacology*, 71:109-14.
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assay, *Journal of Immunological Methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Naczek, M., Shahidi, F., 2004, Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Natarajan, V., Krithica, N., Madhan, B., Sehgal, P. K., 2011, Formulation and evaluation of quercetin polycaprolactone microspheres for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(1), 195-205.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., Maxwell, K. R., Williams, A. S., McAnulty, S. R., Jin, F., Shanely, R.A., Lines, T. C., 2009, Effects of quercetin and EGCG on mitochondrial biogenesis and immunity. *Medicine & science in sports & exercise*, 41(7), 1467-1475.
- Noriega-Luna, B., Godinez, L.A., Rodriguez, F.J., Rodriguez, A., Zaldivar-Lelo de Larrea, G., Sosa-Ferreira, C.F., Mercado-Curiel, R.F., Manriquez, J., Bustos, E., 2014, Applications of dendrimers in drug delivery agents, diagnosis, therapy, and detection. *Journal of nanomaterials*.
- Oellig, C., 2016, Acetonitrile extraction and dual-layer solid phase extraction clean-up for pesticide residue analysis in propolis. *Journal of chromatography A*, 1445, 19-26.
- Okoko, T., Oruambo, I.F., 2009, Inhibitory activity of quercetin and its metabolite on lipopolysaccharide-induced activation of macrophage U937 cells. *Food and chemical toxicology*, 47(4), 809-812.
- Olgierd, B., Kamila, Z., Anna, B., Emilia, M., 2021, The Pluripotent Activities of Caffeic Acid Phenethyl Ester. *Molecules*, 26(5), 1335.
- Ong, T.H., Chitra, E., Ramamurthy, S., Siddalingam, R.P., Yuen, K.H., Ambu, S.P., Davamani, F., 2017, Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Plos one*, 12(3): e0174888.
- Orsolic, N., Basic, I., 2003, Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. *Journal of ethnopharmacology*, 84(2-3), 265-273.
- Oryan, A., Alemzadeh, E., Moshiri, A., 2018, Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 98, 469-483.
- Owens, D.E., Peppas, N.A., 2006, Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 307(1), 93-102.

- Ozdal, Z.D., Sahmetlioglu, E., Narin, I., Cumaoglu, A., 2019, Synthesis of gold and silver nanoparticles using flavonoid quercetin and their effects on lipopolysaccharide induced inflammatory response in microglial cells. *3 Biotech*, 9(6), 1-8.
- Palm, N.W., Medzhitov, R., 2009, Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews*, 227(1), 221-233.
- Park, H.J., Lee, C.M., Jung, I.D., Lee, J.S., Jeong, Y.I., Chang, J.H., Chun, S.H., Kim, M.J., Choi, I.W., Ahn, S.C., Shin, Y.K., Yeom, S.R., Park, Y.M., 2009, Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International immunopharmacology*, 9(3), 261-267.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Aguiar, C. L., 2002, Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(9), 2502-2506.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S. H., 2017, Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Patra, J.K., Das, G., Fraceto, L.F., Campos, E.V.R., Rodriguez-Torres, M.P., Acosta-Torres, L.S., Diaz-Torres, L.A., Grillo, R., Swamy, M.K., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, H.S., 2018, Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*, 16(1), 71.
- Pellati, F., Prencipe, F. P., Bertelli, D., Benvenuti, S., 2013, An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 81, 126-132.
- Pertici, G., 2017, Introduction to bioresorbable polymers for biomedical applications. In: *Bioresorbable polymers for biomedical applications*, 3-29. *Woodhead publishing*.
- Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, I., Naydenski, H., Muli, E., Bankova, V., 2010, New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia*, 81, 509–514.
- Piccinelli, A.L., Campo Fernandez, M., Cuesta-Rubio, O., Márquez Hernández, I., de Simone, F., Rastrelli, L., 2005, Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 9010–9016.
- Pietta, P.G., Gardana, C., Pietta, A.M., 2002, Analytical methods for quality control of propolis, *Fitoterapia*, 73: S7-20.
- Poole-Warren, L.A., Patton, A.J., 2016, Introduction to biomedical polymers and biocompatibility. In: *Biosynthetic polymers for medical applications*, 3-31. *Woodhead publishing*.
- Rabha, B., Bharadwaj, K. K., Baishya, D., Sarkar, T., Edinur, H. A., Pati, S., 2021, Synthesis and Characterization of Diosgenin Encapsulated Poly-ε-Caprolactone-Pluronic Nanoparticles and Its Effect on Brain Cancer Cells. *Polymers*, 13(8), 1322.

- Ramani, T., Auletta, C.S., Weinstock, D., Mounho-Zamora, B., Ryan, P.C., Salcedo, T.W., Bannish, G., 2015, Cytokines: the good, the bad, and the deadly. *International journal of toxicology*, 34(4), 355-365.
- Rassu, G., Cossu, M., Langasco, R., Carta, A., Cavalli, R., Giunchedi, P., Gavini, E., 2015, Propolis as lipid bioactive nano-carrier for topical nasal drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 908-917.
- Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., Veiga, F., 2006, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 2(1), 8-21.
- Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A., 2011, Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the science of food and agriculture*, 91(13), 2363-2370.
- Righi, A.A., Negri, G., Salatino, A., 2013, Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2013, 1–14.
- Romero, V.E., Lim, L.T., Suárez M.H., Bohrer, B.M., 2021, The Effect of Electrospun Polycaprolactone Nonwovens Containing Chitosan and Propolis Extracts on Fresh Pork Packaged in Linear Low-Density Polyethylene Films. *Foods*, 10(5), 1110.
- Rossi, A., Ligresti, A., Longo, R., Russo, A., Borrelli, F., Sautebin, L., 2002, The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomedicine*, 9(6), 530-535.
- Sampietro, D.A., Vattuone, M.M.S., Vattuone, M.A., 2016, Immunomodulatory activity of *Apis mellifera* propolis from the North of Argentina. *LWT*, 70, 9-15.
- Sa Nunes, A., Faccioli, L. H., Sforcin, J. M., 2003, Propolis: lymphocyte proliferation and IFN- γ production. *Journal of ethnopharmacology*, 87(1), 93-97.
- Sattler, S., 2017, The role of the immune system beyond the fight against infection. *The immunology of cardiovascular homeostasis and pathology*, 3-14.
- Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S.Y., Sood, A.K., Hua, S., 2015, Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology*, 6, 286.
- Sforcin, J.M., 2016, Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research*, 30(6), 894-905.
- Sforcin, J. M., 2007, Propolis and the immune system: a review. *Journal of ethnopharmacology*, 113.1: 1-14.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011, Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of ethnopharmacology*, 133, 253–260.

- Sharpe, M., Mount, N., 2015, Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Disease models & mechanisms*, 8(4), 337-350.
- Sherif, M.S., Rehab, T.A., Hamdia, Z.A., Torchilin, V.P., 2018, Cytotoxicity of propolis nanopreparations in cancer cell monolayers: multimode of action including apoptotsis and nitric oxide production. *General physiology and biophysics*, 37(1), 101-110.
- Shrestha, S.P., Narukawa, Y., Takeda, T., 2007, Chemical constituents of Nepalese propolis (II). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 55(6), 926-929.
- Silici, S., Kutluca, S., 2005, Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of ethnopharmacology*, 99(1), 69-73.
- Silva, B.B., Rosalen, P.L., Cury, J.A., Ikegaki, M., Souza, V.C., Esteves, A., Alencar, S.M., 2008, Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 5(3), 313-316.
- Silva-Carvalho, R., Baltazar, F., Almeida-Aguiar, C., 2015, Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.
- Silva, H., Francisco, R., Saraiva, A., Francisco, S., Carrascosa, C., Raposo, A., 2021, The cardiovascular therapeutic potential of propolis—A comprehensive review. *Biology*, 10(1), 27.
- Singh, D., Tanwar, H., Jayashankar, B., Sharma, J., Murthy, S., Chanda, S., Singh, B.S., Ganju, L., 2017, Quercetin exhibits adjuvant activity by enhancing Th2 immune response in ovalbumin immunized mice. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 90, 354-360.
- Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A., 2004, Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *International journal of pharmaceutics*, 278(1), 1–23.
- Son, J.S., Hwang, E J., Kwon, L.S., Ahn, Y.G., Moon, B.K., Kim, J., Kim, D.H., Kim, S.G., Lee, S.Y., 2021, Antibacterial activity of propolis-embedded zeolite nanocomposites for implant application. *Materials*, 14(5), 1193.
- Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Kulkarni, A.R., Rudzinski, W.E., 2001, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of controlled release*, 70(1-2), 1-20.
- Sorkun, K., Süer, B., Salih, B., 2001, Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Zeitschrift für naturforschung C*, 56(7-8), 666-668.
- Sorucu, A., Oruç, H.H., 2019, Determination of biologically active phenolic compounds in propolis by LC–MS/MS according to seasons and altitudes. *Journal of food measurement and characterization*, 13(3), 2461-2469.

- Sosnowski, Z.M., 1983, U.S. Patent No. 4,382,886. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Tang, J., Diao, P., Shu, X., Li, L., Xiong, L., 2019, Quercetin and quercitrin attenuates the inflammatory response and oxidative stress in LPS-induced RAW264. 7 cells: in vitro assessment and a theoretical model. *Biomed research international*, 2019.
- Tauber, A.I., 2003, Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nature reviews molecular cell biology*, 4(11), 897-901.
- Thomson, W. M., 1990, Propolis. *Medical journal of Australia*, 153(11/12).
- Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013, Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013:697390.
- Touzani, S., Embaslat, W., Imtara, H., Kmail, A., Kadan, S., Zaid, H., ElArabi, I., Badiaa, L., Saad, B., 2019, In vitro evaluation of the potential use of propolis as a multitarget therapeutic product: physicochemical properties, chemical composition, and immunomodulatory, antibacterial, and anticancer properties. *BioMed research international*, 1-11.
- Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V., 2007, Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry central journal*, 1(1), 1-4.
- Tsikas, D., 2007, Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *Journal of chromatography B*, 851(1-2), 51-70.
- Tzankova, V., Aluani, D., Kondeva-Burdina, M., Yordanov, Y., Odzhakov, F., Apostolov, A., Yoncheva, K., 2017, Hepatoprotective and antioxidant activity of quercetin loaded chitosan/alginate particles in vitro and in vivo in a model of paracetamol-induced toxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 92, 569-579.
- Ucar, M., Deger, O., Gerigelmez, A.Y., Cengiz, S., Barlak, Y., Ovalı, E., 2016, Effect of Turkish pollen and propolis extracts on caspase-3 activity in myeloid cancer cell lines. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 15(11), 2445-2449.
- Usia, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S., 2002, Constituents of Chinese propolis and their antiproliferative activities. *Journal of natural products*, 65, 673-676.
- Uzel, A., Öncü, Ö., Çoğulu, D., Gençay, Ö., 2005, Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*, 160(2), 189-195.

- Valenzuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., de Las Heras, B., Hortelano, S., Delporte, C., 2015, Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. *Journal of ethnopharmacology*, 168, 37-44.
- Varol, C., Mildner, A., Jung, S., 2015, Macrophages: development and tissue specialization. *Annual review of immunology*, 33, 643-675.
- Volkov, Y., 2015, Quantum dots in nanomedicine: recent trends, advances and unresolved issues. *Biochemical and biophysical research communications*, 468(3), 419-427.
- Wagh, V.D., 2013, Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. *Advances in pharmacological sciences*, 1-11.
- Walle, T., Otake, Y., Walle, U. K., Wilson, F. A., 2000, Quercetin glucosides are completely hydrolyzed in ileostomy patients before absorption. *The journal of nutrition*, 130(11), 2658-2661.
- Walgrave, S.E., Warshaw, E.M., Glesne, L.A., 2005, Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis*, 16(4), 209-215.
- Wang, E.C., Wang, A. Z., 2014, Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integrative biology*, 6(1), 9-26.
- Ward, A.B., Mir, H., Kapur, N., Gales, D.N., Carriere, P.P., Singh, S., 2018, Quercetin inhibits prostate cancer by attenuating cell survival and inhibiting anti-apoptotic pathways. *World journal of surgical oncology*, 16(1), 1-12.
- Weitzberg, E., Hezel, M., Lundberg, J.O., Warner, D.S., 2010, Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: implications for anesthesiology and intensive care. *The journal of the American society of anesthesiologists*, 113(6), 1460-1475.
- Wink, D.A., Mitchell, J.B., 1998, Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free radical biology and medicine*, 25(4-5), 434-456.
- Xiong, G., Ji, W., Wang, F., Zhang, F., Xue, P., Cheng, M., Sun, Y., Wang, X., Zhang, T., 2019, Quercetin inhibits inflammatory response induced by LPS from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts via suppressing NF- κ B signaling pathway. *BioMed research international*, 1-10.
- Xu, W., Ling, P., Zhang, T., 2013, Polymeric micelles, a promising drug delivery system to enhance bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Journal of drug delivery*, 1-15
- Yang, D., Wang, T., Long, M., Li, P., 2020a, Quercetin: its main pharmacological activity and potential application in clinical medicine. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- Yang, W., Gu, Z., Zhang, H., Hu, H., 2020b, To TRIM the immunity: from innate to adaptive immunity. *Frontiers in immunology*, 11.

- Yona, S., Kim, K.W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume D.A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E., Jung, S., 2013, Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79-91.
- Yuan, X., Wang, Y., Shi, B., Zhao, Y., 2018, Effect of propolis on preserving human periodontal ligament cells and regulating pro-inflammatory cytokines. *Dental traumatology*, 34(4), 245-253.
- Yun, H.Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1997, Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Molecular psychiatry*, 2(4), 300-310.
- Zaccaria, V., Curti, V., Di Lorenzo, A., Baldi, A., Maccario, C., Sommati, S., Mocchi, R., Daglia, M., 2017, Effect of green and brown propolis extracts on the expression levels of microRNAs, mRNAs and proteins, related to oxidative stress and inflammation, *Nutrients*, 9(10), 1090.
- Zauner, W., Farrow, N.A., Haines, A.M., 2001, In vitro uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *Journal of controlled release*, 71(1), 39-51.
- Zhang, H., Fu, Y., Xu, Y., Niu, F., Li, Z., Ba, C., Jin, B., Chen, G., Li, X., 2019, One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of propolis. *Food & function*, 10(2), 635-645.
- Zielinska, A., Carreiro, F., Oliveira, A.M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D.N., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A.M., Santini, A., Souto, E.B., 2020, Polymeric nanoparticles: Production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*, 25(16), 3731.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Toghrul SADIKHOV
Doğum Yeri	Azerbaycan
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	☐ T.C. ☒ Diğer: Azerbaycan
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Sumgayit Devlet Üniversitesi
Fakülte	Kimya ve Biyoloji Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Öğretmenliği
Mezuniyet Yılı	02.07.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı