

NOT İmmünoloji

Humus Ekstraktı nı n Murine Transplantable L1210 Lösemi Üzerinde Antitümör Etkisi

Hiroshi KODAMA1)* ve DENSO1)

1)Veteriner İmmünoloji Laboratuvarı , Veterinerlik Bilimi Kursu, Yaşam ve Çevre Bilimleri Enstitüsü, Osaka Prefektörlük Üniversitesi, Sakai, Osaka 599-8531, Japonya

(2 Mayıs 2007'de alındı /12 Haziran 2007'de kabul edildi)

ÖZ. Hüyük maddeler, organik madde ve mikroorganizmaları n bulunduğ u birçok doğ al ortamda bulunan humustaki organik maddenin ayrı ş ması sı rası nda oluş ur. Bu çalı ş mada, humus ekstraktı , izogeneik DBA/2 farelerinde L1210 tümör geliş imi üzerinde, tümör oluş umunun gecikmesi ve farelerin yaş am süresinde önemli bir artış anlamı na gelen önemli ölçüde daha küçük bir tümör kütleli ile antitümör etkisi sergiledi. Antitümör etkisi, L1210'un doğ rudan öldürülmesinden veya humus ekstraktı tarafı ndan tümör hücrelerinde apoptozun indüklenmesinden kaynaklanmamı ş tı r.

ANAHTAR KELİ MELER: antitümör aktivite, hüyük madde, humus özü

Vet. İ le. bilim 69(10): 1069-1071, 2007

Hüyük maddeler, humustaki organik maddenin ayrı ş ması sı rası nda oluş ur. Organik materyallerin ve mikroorganizmaları n bulunduğ u birçok doğ al ortamda bulunabilirler [13]. Humus, turba, sapropel ve mumya gibi doğ al nemlendirme ürünleri, tı bbi uygulamada çeş itli uygulamalara sahip farmakolojik ajanlar geliştirmek için kullanı lmı ş tı r [5, 12, 14]. Bunlar, lokal anti-inflamatuar ve analjezik özelliklere sahip oldukları için anti-inflamatuar ajanlar olarak baş arı yla kullanı lmaktadı r [6, 10, 14]. Kömür türevi hüyük asit ve fulvik asit [9] ve humus ekstraktı nı n [2] antimikrobiyal etkisi araştı rı lmı ş tı r. Oksihumatu n [11] ve sentetik hüyük asit analogları nı n [8] anti-HIV aktivitesi de rapor edilmiş tir.

Ancak hüyük maddelerin tümöre karşı potansiyeli çok az araştı rı lmı ş tı r. Bu nedenle, humus ekstraktı nı n in vivo antitümör aktivitesi, farelerde transplante edilebilir lenfositik lösemi L1210 hücrelerine karşı incelenmiş tir.

Humus ekstraktı , Kodama ve diğ erleri tarafı ndan aç ılanan yöntemeye göre (Nagasaki Eyaleti, Kyushu, Japonya'da toplanan) humustan hazı rlandı . [2]. Humusa 6 hacim klorsuz su (v/w) ilave edildi ve karı ş ı m 30 gün boyunca her gün çalkalandı , ardından 4 ay boyunca 25 ila 28°C'de beklemeye bırakıldı . Süpernatant toplandı ve bir membran filtre (gözenek boyutu: 25 m) kullanı larak süzüldü. Ortaya ç ı kan humus ekstraktı pH2.8'e sahipti ve NaCl ve Si dahil olmak üzere çeş itli mineraller iç eriyor. Ekstrakt 1,500 ppm sülfat iç eriyordu. Ekstrede kültürlenebilir bakteri bulunmadı . Küçük miktarlarda protein ve karbonhidrat vardı (toplam ağı rlı ğ ı n %0,7'si).

Her iki cinsiyetten sekiz haftalı k kendilenmiş DBA/2 fareleri gruplara ayrı ldı (her grupta 6 fare) ve tümör hücreleri enjekte edilmeden önce 18 gün boyunca kloru giderilmiş musluk suyu (%3 veya %6) ad libi tum humus özütü uygulandı . Kontrol farelerine humus ekstraktı iç ermeyen su verildi. iso

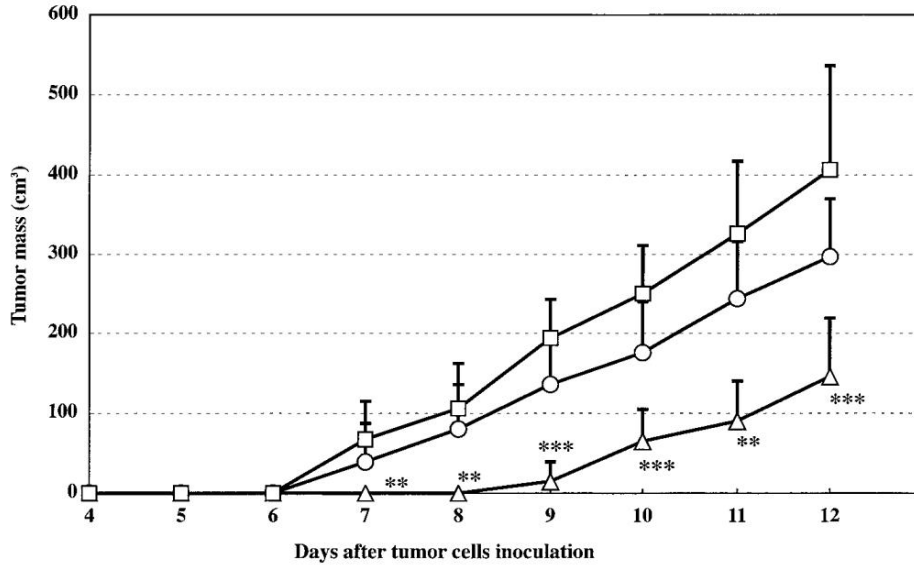
* Yazı ş ma Adresi : KODAMA, H., Veteriner İmmünoloji Laboratuvarı , Veterinerlik Bilimi Kursu, Yaşam ve Çevre Bilimleri Enstitüsü, Osaka İ li Üniversitesi, Sakai, Osaka 599-8531, Japonya. e-posta: kodama@vet.osakafu-u.ac.jp

genetik L1210 lenfositik lösemi hücre hattı hücreleri (Dr. Kiyomiya, Veteriner Toksikoloji Laboratuvarı , Yaşam ve Çevre Bilimleri Enstitüsü, Osaka İ li Üniversitesi, Sakai, Japonya'nı n izniyle verilmiş tir) Eagle's Minimum Essential Medium'da (Nissui Pharmaceutical Co. , Tokyo, Japonya) 37°C'de %10 fetal sı ğ ı r serumu ve antibiyotiklerle desteklenmiş tir. Her farenin sı rtı na deri altı ndan 106 / 0.1 ml L1210 hücreleri aşı landı . Humus ekstraktı , tümör hücreleri aşı laması ndan sonra 12 gün boyunca uygulandı . Fareler, aşı lan bölgede herhangi bir tümör oluş umu aç ı sı ndan gözlemlendi; Osaka-İ li Üniversitesi Hayvan Bakı mı ve Kullanı mı Komitesi yönergelerine göre tümör kütleli 18 x 18 mm'yi aş tı ğ ı nda deney sonlandı rıldı .

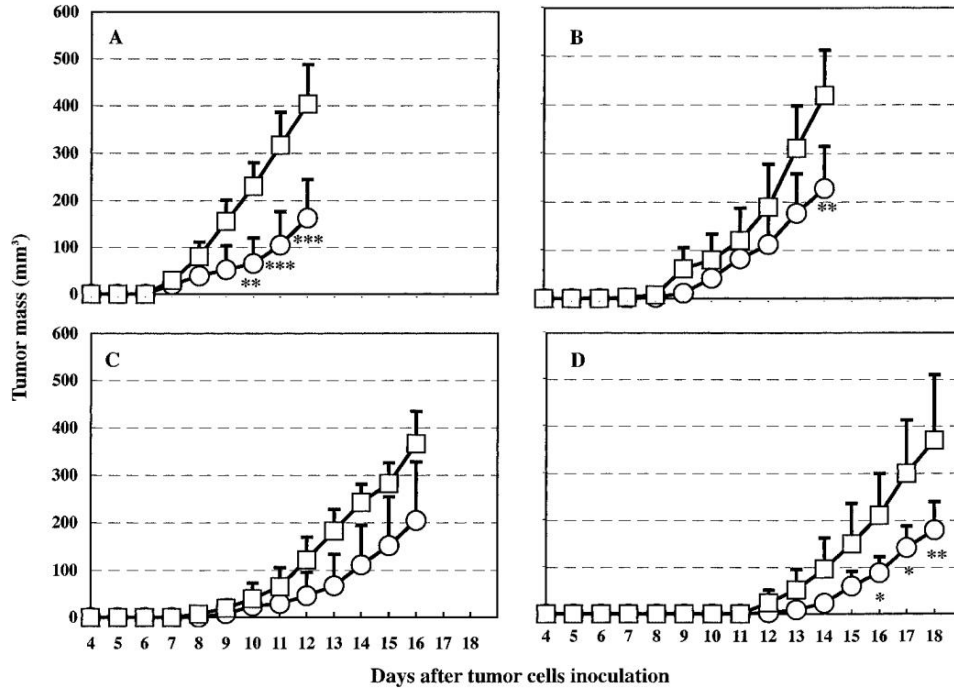
Ş ekil 1'de gösterildi ğ i gibi, %6 humus ekstraktı uygulanan gruplarda ve kontrol farelerinde ilk olarak L1210 hücre aşı laması ndan 7 gün sonra büyük tümör gözlenirken, %3 ekstrakt verilen farelerde aşı lamadan 9 gün sonra tümör oluş tu. Daha sonra üç fare grubunda tümörler sürekli olarak gelişt i, ancak %3 humus ekstraktı ile tedavi edilen fareler, belirgin bir yavaş tümör büyümesine yol aç tı ; yani ortalama tümör kitlesi, kontrol grubu ile karşı laşt ı rı ldı ğ ı nda önemli ölçüde daha küç üktü (P<0.001-0.01, Student t testi).

İ kinci denemede, tümör hücreleri enjekte edilmeden önce farelere 18 gün boyunca %3 humus özütü uygulandı . Farelere farklı sayı da L1210 hücreleri (105 , 103 veya 102 hücre/0.1 ml/fare) aşı landı .¹⁰⁴, Deney süresi boyunca humus ekstraktı uygulandı . Ş ekil 2, humus ekstraktı nı n, aşı lan tümör hücrelerinin sayı sı ndan bağı msız olarak farelerde tümör büyümesini baskı ladı ğ ı nı göstermektedir. Ortalama tümör kütleli, kontrol faresi grupları na kı yasla 105 +104 ve 102 hücre aşı lanmış gruplarda önemli ölçüde daha küç üktü (P<0.001-0.05).

Humus ekstraktı nı n L1210 hücre proliferasyonu üzerindeki in vitro etkisi incelenmiş tir. L1210 hücreleri (2 x 10⁶ hücre/2 ml , 24 oyuklu kültür plakası nda), %0 ila %6 humus ekstraktı mevcudiyetinde beş gün boyunca yetiştirildi. Canlı hücre sayı sı , tripan mavisi boya dı ş lama testi ile bir hemasitometre kullanı larak her gün tahmin edildi. Ş ekil 3'te gösterildi ğ i gibi, yüksek konsantrasyon



Ş ekil 1. Sı rtta deri altı ndan 106/0.1 ml L1210 hücresinin aş ı lanması ndan sonra %3 (○) veya %6 (□) humus ekstraktı uygulanan farelerde tümör büyümesinin baskı lanması . İ statistiksel anlamlı lı k, humus ekstraktı olmadan uygulanan farelere kı yasla Student t testi ile belirlendi (○) (***) P<0.001 veya (**), 0.01).

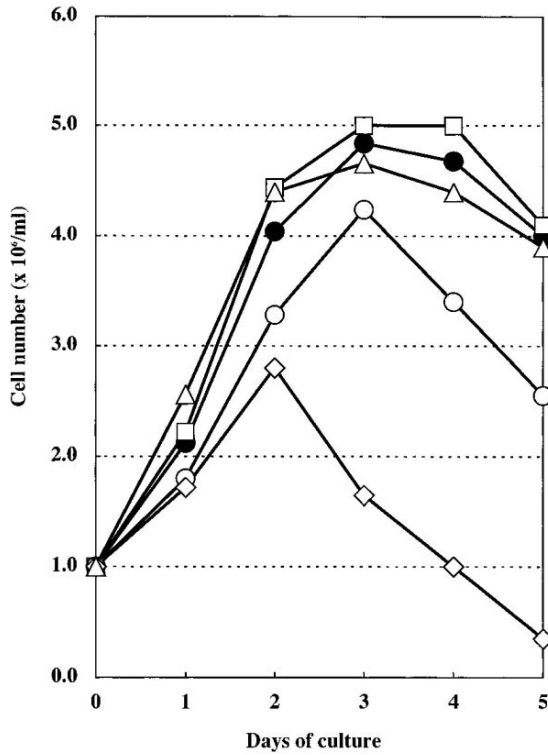


Ş ekil 2. Farklı sayı da L1210 hücresinin (A; 105 , B; 104 , C; 103 veya D; 102 hücre/0.1 ml) aş ı lanması ndan sonra %3 (○) humus ekstraktı ile uygulanan farelerde tümör büyümesinin baskı lanması . İ statistiksel anlamlı lı k, humus ekstraktı

□

Kültürlerdeki humus ekstraktı nı n (%3 veya %6) L1210 hücrelerinin büyümesini baskı ladı ğ ı , ancak %0.5 veya %1'in hücre büyümesini etkilemediğ i görülmüş tür. Nükleer kon gibi apoptozun morfolojik özelliklerini gösteren hücrelerde önemli bir artış yok

hücreler Hoechst 33258 (Sigma, St. Louis, MO) ile boyandı ğ ı nda ve bir floresan mikroskopu altı nda gözlemlendiğ inde, herhangi bir grupta yoğ unluk ve apoptotik cisimlerin görünümü gözlemlendi.



Şekil 3. L1210 hücrelerinin in vitro büyüme eğrisi. Hücreler, %6 (□), %3 (△), %1 (○), %0.5 (◇) humus ekstraktı varlığında ve (●) humus ekstraktı olmadan yetiştirildi.

Bu nedenle, %3 humus ekstraktı, L1210 tümör gelişimi üzerinde, tümör oluşumunun gecikmesi ve önemli ölçüde daha küçük bir tümör kütlesi ile antitümör etkisi sergiledi; bu, ekstrakt uygulanan farelerin, tümörlerin oluşumundan sonra tedavi edilmeyen farelere göre daha uzun süre hayatta kalabileceğini gösterir. Bununla birlikte, %6 humus ekstraktı uygulanan farelerde tümör büyümesi, kontrol farelerine kıyasla önemli ölçüde bastırılmıştır; bu, ekstraktın hayvanlara uygulanması için en uygun koşulları mevcut olduğunu gösterir. Bu nedenle, balıklarda [2] ülser hastalığına ilişkin deneysel enfeksiyonlarında ve farelerde tripanozomiyazda (yayımlanmamış veriler) benzer fenomeni gözlemlediğimiz için, ekstraktın optimal konsantrasyonunu ve uygulama süresini belirlemek gereklidir. Antitümör etkisi, L1210'un doğrudan öldürülmesinden veya humus ekstraktı tarafından apoptotik hücre ölümünün indüklenmesinden kaynaklanmamıştır, çünkü in vitro test, yüksek konsantrasyonlar (%3) dışında, ekstraktın hücrelerde dikkate değer bir büyüme baskılaması göstermediğini (%0,5 veya %1) göstermiştir. Ayrıca, %6 humus ekstraktı varlığında yetişen L1210'da apoptotik özellik gözlemlenmedi. Humus ekstraktının tümör büyümesini baskıladığı mekanizma şu anda net olmasa da, antitümör aktivite, doğuştan gelen konakçı direncinin artırılmasını içerebilir. Bu nedenle, farelerde humus ekstraktının uygulanmasından sonra doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin nasıl indüklendiğini belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Bağışıklak yoluyla absorbe edilen hümkik maddelerin konakçı fizyolojisini etkilediğini varsaymak mantıklıdır.

tümör hücresi büyümesine karşı koruma sağlayan biyolojik koşullar. Mumie'nin fare dalak lenfositleri tarafından [3H]timidin alımını artırdığı bildirilmiştir [7]. Ayrıca, humik madde mitojenler tarafından uyarılan ti mositlerin proliferatif kapasitesini artırdığı ve hidrokortizonun immün baskılayıcı etkisini engellemiştir [4]. Humus ekstraktı ve saflaştırılmış fulvik aside yanıt olarak lenfositlerin çoğalması ve humusla tedavi edilen farelerin lenfositlerinin L1210 hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi şu anda araştırılmaktadır. Fulvik asit herhangi bir belirgin yan etkiye neden olmadığından [5, 10], hümkik maddeler ve/veya humus ekstraktı hayvanlardaki katkı maddeleri ve immüno-güçlendirici maddeler olarak kullanılabilir. Bununla birlikte, son zamanlarda Tayvan'da kara ayak hastalığına ilişkin vaskülopatisinde etiyolojik bir faktör olarak hümkik asidin yer aldığı bildirilmektedir [1] ve kültürlenmiş insan hücrelerinde apoptotik değişiklikler indüklediği ve hücrelerde neoplastik transformasyonu teşvik eder [3]. Bu nedenle, hümkik maddenin etkisini ve yan etkilerini aydınlatmak için humus ekstraktı tarafından aktive edilen antitümör mekanizmaları daha fazla analiz edilmesi ve humustaki biyolojik olarak aktif bileşenlerin ayrılması gerekmektedir.

TEŞ EKKÜRLER. Yazarlar, faydalı önerileri için Profesör Tohru Miyajima'ya (Fen ve Mühendislik Fakültesi, Saga Üniversitesi, Saga, Japonya) ve Dr. Hisanori Mayumi'ye (Souju Memorial Hastanesi, İwatsuki, Japonya) minnettar. Bu çalışmada, Japon Bilimi Geliştirme Derneği'nden (No. 18580311) bir Hibe Yardımı ile desteklenmiştir. Bu çalışmada ayrıca Marix Co., Sakai, Japonya tarafından finanse edilmiştir.

REFERANSLAR

- Hseu, Y., Huang, H., Wang, S., Chen, H., Lu, F., Gau, R. ve Yang, H. 2002. *Toxicol. Uygulama Eczane.* 182: 34-43.
- Kodama, H., Denso ve Nakagawa, T. 2007. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 405-408.
- Lu, F., Tseng, T., Lee, W., Yen, C., Yin, Y., Liao, C. ve Liu, K. 2006. *Chem. Biol. Etkileşime girmek.* 162: 249-258.
- Obmiřka-Domoradzka, B. ve Stefařka-Jořta, M. 2001. *Fitoterapi* 8: 184-194.
- Reichert, B. 1966. *Deut. Eczacı* 18: 204-206.
- Salz, H. 1974. *Orta Ay.* 28: 548-550.
- Schetkin, IA, Khlebnikov, AI, Ah, SY, Woo, SB, Jeong, C.-S., Klubachuk, ON ve Kwon, BS 2003. *J. Agri kült. Gi da Kimyası* 51: 5245-5254.
- Schneider, J., Weis, R., Manner, C., Kary, B., Werner, A., Seibert, BJ ve Riede, UN 1996. *Virology* 218: 389-395.
- Van Rensburg, CEJ, Van Straten, A. ve Dekker, J. 2000. *J. Antimikrob. kimyager.* 46: 853-854.
- Van Rensburg, CEJ, Malfield, SCK ve Dekker, J. 2001. *İlaç Dev. Res.* 53: 29-32.
- Van Rensburg, CEJ, Dekker, J., Weis, R., Smith, T.-L., Van Rensburg, EJ ve Schneider, J. 2002. *Chemotherapy* 48: 138-143.
- Vengerovskii, AI, Golovina, EL, Burkova, VN ve Saratkov, AS 2001. *Exp. Klinik. Eczane.* 64: 46-48.
- Visser, SA 1973. *Açta Biol. İle mikrop.* 31: 569-581.
- Yudina, NV, Pisareva, SI ve Saratkov, AS 1998. *Khim. Rastit Sırya* 4:29-32.