



Hümik asitlerin, farklılaşmış U937 hücrelerinden LPS ile indüklenen TNF-a salınımı üzerindeki bimodal etkisi

R. Juneka^a, R. Morrow^b, J. Schoenherr^a, R. Schubert^a, R. Kallmeyer^a, S. Phull^b, R. Kloßking^a,

^aDoğa Bilimleri Bölümü Zittau/Görlitz Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, D-02763 Zittau, Almanya

^bBiyolojik ve Moleküler Bilimler Bölümü Sağlık ve Yaşam Bilimleri Fakültesi, Coventry Üniversitesi, CV 5FB Coventry, Birleşik Krallık

Soyut

Hümik maddelerin (H2S) iltihap önleyici ve iltihap önleyici özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Anti-enflamatuar aktivite, sıçan pençe ödem modelinde gösterildi ve hümik asitlerin (HA) 5-lipoksijenaz inhibe edici etkisinde bir ön açıklama bulduk. Proinflammatuar aktivite, HA ile muamele edilmiş nörofilik granülositlerde proinflammatuar sitokinlerin üretimi ve salınmasıyla yansıtılır. HA'nın antiviral ve UV-koruyucu ajanlar olarak potansiyel kullanımı ile ilgili olarak, hümik maddelerin inflamasyon sürecindeki rolünün daha detaylı araştırılması tavsiye edilebilir görünmektedir. Bu nedenle, dört farklı hümik madde müstahzarını test ettik - ikisi Almanya'daki Alteich turbalıklarından doğal olarak oluşan HA, bir Fin ladin ormanından bir fulvik asit (FA) müstahzarı ve sentetik bir HA benzeri polimer (kafeik asit oksidasyon ürünü KOP). İnsan U937 hücrelerinde lipopolisakarit (LPS) kaynaklı TNF-a salınımı. Ek olarak, hümik maddelerin sitotoksitesi belirlendi.

Sonuçlar, hem Alteich turbalığından doğal siyah turba HA hem de HA benzeri polimer KOP için farklılaşmış LPS ile uyarılmış U937 hücrelerinin TNF-a salınımı üzerinde HA'nın konsantrasyona bağlı iki modlu bir etkisini göstermektedir. Düşük HA konsantrasyonları (10-80 mg/ml) TNF-a salınımını üç kate kadar arttırdı (pro-inflamatuar aktivite), 4100 mg/ml HA konsantrasyonları ise yaklaşık 10 kat azalttı (anti-inflamatuar aktivite). FA, TNF- α salınımını arttırmada baş arısız oldu, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda (4200 mg/ml) yarı yarıya azalttı. Kahverengi su HA, TNF-a salınımı üzerinde önemli bir etki göstermedi. Eksojen olarak sağlanan LPS'nin yokluğunda hiçbir HS ile uyarılan TNF-a salımı da gözlenmedi. Bu, endotoksinlerden farklı olarak HS'nin, LPS ile işlenmemiş hücreler için inflamasyona neden olan ajanlar olmadığı anlamına gelir. Bireysel hümik maddelerin TNF-a salımı üzerindeki etkisindeki farklılıklar, hümik maddelerin polianyonik karakteri, moleküler kütle dağılımları ve şimdiye kadar kusurlu olarak bilinen kimyasal yapısı ile bağlantılı olarak tartışılmaktadır. 2008 Elsevier GmbH. Tüm hakları Saklıdır.

Anahtar Kelimeler: Humik asitler; Fulvik asitler; TNF-a; U937 hücreleri; LPS; iltihaplanma

Giriş

Doğal humik maddeler (HS), tercihen nemlendirme sırasında çürüyen bitki materyallerinden kaynaklanan sarıdan koyu kahverengiye kadar renkli organik moleküllerin tüm topluluğunu temsil eder. Onlarınkine göre

Sorumlu yazar. Tel.: +49 3583 612303; faks: +49 3583 612300.

E-posta adresi: RKloeking@hs-zigr.de (R. Kloßking).

alkalin ve/veya asit ortamda çözümlük üç ana H2S fraksiyonu ayırt edilir: pratikte çözümlenmeyen humin, alkalide çözümlenen hümitik asitler (HA) ve alkalik, nötr ve asit ortamda çözümlenen fulvik asit (FA) fraksiyonu. Çözümlenmeyen huminin aksine, HA ve FA'nın büyük bir yüzdesi, en yaygın fonksiyonel gruplar olarak fenolik hidroksil ve karboksil grupları ile polianiyonik özelliklere sahiptir (Perdue, 1985). HA'nın kimyasal yapısını aydınlatmak için büyük çaba gösterilmesine rağmen, doğal hümitik maddelerin oldukça karmaşık bileşimi nedeniyle temel yapılarının genel olarak geçerli bir ilkesi henüz bulunamamıştır. Bu nedenle, basit sentetik HA'nın analizi, gelecekteki araştırmalarda sorunu ele almak için umut verici bir girişim olarak kabul edilir (Klocking ve diğerleri, 2008).

Hümitik maddelerin ana doğal kaynağı, kuru kütlede %30'dan fazla organik madde (esas olarak H2S) içeren turbadır. Hümitik maddeler, jinekolojik ve romatizmal rahatsızlıklara yönelik geleneksel turba uygulamalarının fiziksel temelini oluşturur (Baatz, 1988; Kleinschmidt, 1988) turbanın olağanüstü kapasitesine önemli katkıda bulunur (Young ve LeBoeuf, 2000).

HA'nın antiviral ve UV-B koruyucu etkisine ilişkin artan bilgiyle bağlantılı olarak (Klocking ve diğerleri, 2000, 2004; Klocking ve Helbig, 2001), UV-B kaynaklı cildi önlemek için HA'nın potansiyel kullanımı hastalıklar yeni bir ilgi odağı haline gelmiştir. Büyük ölçüde turba kütlelerinde çözümlenmemiş HA içeren turba banyosu veya turba paketleri olarak turba uygulamasının aksine, izole edilmiş HA (çoğunlukla çözümlenmiş sodyum veya amonyum tuzları formunda) vücutla doğrudan temas halindedir. Bu nedenle, HA'nın cilt uyumluluğu ve bunların enflamatuar süreçler üzerindeki etkisi sorusu özellikle önemlidir.

Hümitik maddelerin anti-inflamatuar ve ayrıca proinflamatuar özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Anti enflamatuar aktivite, sıçanlarda pençe ödemi modelinde ve granülom kese modelinde gösterildi (Taugner, 1963; Klocking ve diğerleri, 1968). Biyokimyasal düzeyde, araştırmacılar asit (AA) zincirinin 5-lipoksijenaz yolunun doğal olarak oluşan HA ve ayrıca sentetik HA benzeri polimerler tarafından inhibisyonu, HA'nın anti-inflamatuar etkisi için bir açıklama sağlamıştır (Schewe ve ark., 1991). Ayrıca, ısı kaynaklı AA salınımının sodyum humat ve HA benzeri kafeik asit oksidasyon ürünü (KOP) tarafından %65-90 oranında bastırılması, HA'nın antiinflamatuar maddeler olarak nitelendirilmesini desteklemiştir (Dunkelberg ve diğerleri, 1997; Klocking ve diğerleri, 1997). Öte yandan, HA'nın nörofilik granülositlerde proinflamatuar tümör nekroz faktörü-1 (TNF-a) ve interleükin-1 beta (IL-1b) salınımını uyardığı gösterilmiştir (Riede, 2000; Zeck-Kapp ve ark., 1991). Inglot ve ark. (1993) zaten bir turba ekstraktının düşük moleküler HA içeren bir fraksiyonunu bildirmiştir.

(Tołpa turba hazırlığı, TPP) insan periferik kan lökositlerinde TNF-a ve interferonu indükler.

Proinflamatuar sitokin TNF-a, gram-negatif bakterilerin endotoksin lipopolisakarit (LPS) ve gram-pozitif bakterilerden peptidoglikan, lipoteikoik asit ve lipoproteinler gibi inflammatuar uyarılara yanıt olarak farklı hücre tipleri, özellikle makrofajlar ve monositler tarafından üretilir. (Fan ve diğerleri, 2005). LPS, farklılaşmış, makrofaj benzeri U937 hücrelerinde de TNF-a salınımını uyarır. Bu hücreler, birkaç bakteriyel enfeksiyona karşı TNF-a tepkisini araştırmak için bir in vitro model olarak uygulanmıştır (Caron ve diğerleri, 1994; Roberts ve diğerleri, 1997) ve bu çalışmadaki araştırmalar için seçilmiştir.

Almanya'daki Alteich turbalıklarından iki HSI, bir Fin ladin ormanından fulvik asitler (FA'lar) ve sentetik HA benzeri kafeik asit oksidasyon ürünü KOP dahil olmak üzere dört farklı HSI, insan U937'de LPS kaynaklı TNF-a üretimi üzerindeki etkileri açısından test edilmiştir. Hümitik maddelerin TNF-a sandviç ELISA bileşenleri ile çapraz reaksiyonlarını önlemek için test protokolü özel gerekliliklere göre uyarlanmıştır. Ek olarak, test maddelerinin U937 hücrelerine karşı sitotoksitesi, XTT tetrazolyum indirgeme tahlili EZ4U kullanılarak belirlendi.

Sonuçlar, insan U937 hücrelerinde LPS ile uyarılmış TNF-a salımı üzerinde HA'nın konsantrasyona bağlı iki modlu bir etkisini gösterir; bu, LPS ile uyarılmamış ve FA ile işlenmiş hücrelerde saptanamaz. Bu bulgular, esas olarak HA'nın polianiyonik karakteri, moleküler kütle dağılımları ve HA ve FA'nın şimidiye kadar kusurlu bir şekilde anlaşılabilir kimyasal yapısındaki olası farklılıklar açısından tartışılmaktadır.

Malzemeler ve yöntemler

Kimyasallar

E. coli'den lipopolisakarit (LPS), Serotip 055:B5, all-trans retinoik asit (A vitamini asidi) ve kolekalsiferol (D3 vitamini), Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Almanya'dan satın alınmıştır. RPMI 1640 ortamı (fenol kırmızısı ve L-glutamin içeren ve içermeyen) CC-Pro, Oberdorla, Almanya'dan temin edildi. Fetal siğir serumu (FBS) ve Dulbecco'nun Ca2+/Mg2+ içermeyen fosfat tamponlu salini (PBS) Biochrom, Berlin, Almanya'dan alınmıştır. Diğer tüm kimyasallar ve biyokimyasallar ticari kaynaklardan satın alındı ve mevcut olan en yüksek kalitedeydi.

Hücre kültürüne farklılaşması

Promonositik insan hücre dizisi U937 (ATTC CRL 1593), %10 FBS içeren RPMI içinde yetiştirildi

1640 ortamı, 37 1C'de ve %5 CO₂'de , nemli bir atmosferde. U937 hücrelerinin TNF-a üretmesi için gerekli olan makrofaj benzeri hücrelere doğru farklılaş ma, Caron ve diğ. (1994). Hücre ortamına 107 mol/l all-trans retinoik asit ve 107 mol/l 1,25 dihidroksivitamin D3 yerine 106 mol/l all trans retinoik asit ve 106 mol/l konsantrasyonda vitamin D3 uygulandı. 3 gün için

yetiş tirme.

test maddeleri

Kara turba humik asitleri (BLP-HA), Almanya'nın Aş ağı Lusatia bđgesinde yer alan Alteich Turbalıklarının turbasından çıkarıldı. Bunun için 50 g turba çalkalama (300 rpm) altında 300 ml deiyonize su içinde süspanse edildi ve 1 saat 0.2 mol/l sodyum hidroksit ile özüç ıkarıldı. Çözünmemiş parç acıklar santrifüleme (3500 g, 20 dakika) ve ardından membran filtrasyon (selüoz asetat filtre 0.45 mm, Sartorius AG, Göttingen, Almanya) ile çıkarıldı. Çözünmüş BLP-HA, pH 1.5-2.0'da 1.0 mol/l HCl ile ç ökteldi, santrifüleme (3500 g, 20 dakika) ile ç özeltiden ayrıldı, deiyonize su ile iki kez durulandı ve liyofilize edildi. Yüksek performanslı boyut dış lama kromatografisi (HPSEC) ile belirlenen BLP-HA'nın moleküler kütle dağılımı, biri yaklaşık ık 27.6 kDa'da küçük ve yaklaşık ık 2.0 kDa'da büyük bir ikincisi olmak üzere iki tepe ile karakterize edilir (Kinne ve diğ erleri, 2005).

Kahverengi su humik maddeleri (BRW-HS), Alteich Peatland'ı kaplayan drenaj kanalından elde edildi. Kahverengi su, 1.0 kDa OMEGA polietersülfon membrandan (PALL GmbH, Dreieich, Almanya) ultrafiltrasyon yoluyla konsantre edildi, ardından tutulan kısım liyofilizasyona tabi tutuldu. Moleküler kütle dağılımı, yaklaşık ık 1,3-1,4 kDa'da yalnızca tek bir tepe noktası gösterir (Kinne ve diğ erleri, 2005).

Fulvik asit (FA), Prof. Dr. Martin Hofrichter (Çevresel Biyoteknoloji Birimi, Uluslararası Enstitüsü Zittau, Almanya). Bir Fin ladin ormanından IHSS yöntemine göre hazırlanmış tır (Aiken, 1985). Moleküler kütle dağılım eğrisinin maksimum değeri 1.09 kDa'da bulundu (Kinne ve diğ erleri, 2005).

Sentetik HA benzeri bir polimer olan Na-KOP, daha önce açıkladığı gibi kafeik asitten periyodat oksidasyonu ile sentezlenmiş tır (Helbig ve diğ erleri, 1997). Koyu kahverengi ürün suda ve zayıf alkali ortamlarda iyi ç özüür. Moleküler kütle dağılımı, yaklaşık ık 22 kDa'da küçük bir tepe noktası ve yaklaşık ık 1.6 kDa'da büyük bir ikinci tepe gösterir (Kinne ve diğ erleri, 2005). Na-KOP, FT-IR spektroskopisi ve klasik ıslak kimyasal yöntemlerle (Helbig ve diğ erleri, 1997), 13C ve H NMR spektrumları (Hanninen ve diğ erleri, 1987) ve kromatizasyon halinde

piroliz gazı kromatografisi/kütle spektroskopisi ile (Poerschmann ve diğ., 2003).

Sitotoksisite tayini

HS'nin sitotoksisitesi, XTT tetrazolyum indirgeme tahlili EZ4U (Biozol, Eching, Almanya) kullanılarak 96 oyuklu düz dipli mikrotitre plakalarında belirlendi. Tahlil, Klocking ve diğ erleri tarafından U937 hücreleri için uygulanmış tır . (1998) ve hücre sayısı ve inkübasyon süresi ile ilgili olarak biraz değış tirildi. Kısaca, oyuk baş ına 106 hücre/ml içeren 100 ml serumsuz RPMI 1640 kullanıldı ve renksiz RPMI ortamında 100 ml seri seyreltilmiş H₂S eklendi. HS içermeyen ortam alan hücre kontrolleri için en az altı kuyuluk bir set ayrılmış tır. XTT reaktifi eklenmeden önce hücreler sırasıyla 1 ve 24 saat 37 1C'de inkübe edildi. 37°C'de 3 saat daha inkübasyondan sonra, üretilen formazanın optik yoğunluğu (OD), bir mikropilaka okuyucuda (SynergyTM, BIO-TEKs, Inc., Winooski, VT) 492 nm'de (referans dalga uzunluğu: 620 nm) ölçüldü, AMERİKA BİRLEŞ İK DEVLETLERİ). Sitotoksisite yüzdesi, aş ağıdaki denklem kullanılarak ölçülen OD değerlerinden hesaplandı: [OD_{xo}OD_{xi}/ OD_{xo}] %100, burada xi ve xo sırasıyla numune değerlerinin ve hücre kontrollerinin aritmetik ortalamasıdır.

TNF-a salınımının belirlenmesi

Farklılaş tırılmış U937 hücreleri, 200 g'de santrifüldendi, 5 dakika süreyle iki kez PBS ile yıkandı ve %10 FBS içeren 106 hücre/ml yoğunlukta yeniden süspanse edildi. RPMI 1640.

Deneye baş lamadan önce, serumsuz, renksiz RPMI 1640 içinde seri olarak seyreltilmiş 50 ml H₂S ve ardından FBS içeren RPMI içinde 50 ml LPS (2 mg/ml) 96 oyuklu bir plakanın test oyuklarına dolduruldu. Bir saat sonra 100 ml hücre süspanasyonu eklendi. Doz-yanıt eğrisi için sağlanan bu numunelerin yanı sıra, LPS ve HS'siz hücre kontrolleri, bazal TNF-a salınımını belirlemek için LPS'li ancak HS'siz hücreler ve olası ç aprazlamayı saptamak için HS'li ancak LPS'siz hücreler ELISA Kitinin bileş enleri ile humik maddelerin reaktivitesi, her deneye dahil edildi. 37°C'de 4 saatlik inkübasyonun ardından plakalar, 300 g'de 5 dakika santrifüldendi ve her süpernatandan 60 ml, bir mikro test tüpüne aktarıldı ve TNF-a tayini yapılabildi kadar 80°C'de saklandı.

TNF-a konsantrasyonu, üreticinin talimatlarına göre BioLegend İnsan TNF-a ELISA MAXTM Kiti (Biozol, Eching, Almanya) kullanılarak belirlendi. HA'nın sandviç ELISA Kitinin bileş enleriyle yüksek ç apraz reaktivitesi ve ilgilenilen konsantrasyon aralığında (4-125 pg/ml) TNF-a için yüksek bir hassasiyet elde etmesi nedeniyle, yöntem biraz değış tirildi. Önerilen BioLegend testi yerine

seyreltilici olarak, seyreltilici (antikör ve avidin-yaban turpu peroksidazı saptamak için) ve bloke edici reaktif olarak PBS içinde %0.5 BSA çözeltisi kullanıldı. Her oyukta aynı nihai BSA konsantrasyonunu elde etmek için numuneler ve standart TNF-a sırası, sırasıyla %1.0 ve %0.5 BSA ile desteklenmiş FBS içeren RPMI 1640 ortamı ile seyreltildi.

Test plakası 2 saat kapalı tutuldu ve yaklaşık 140 rpm'de hafifçe çalkalandı. Kalan adımlar (tespit antikoru, avidin-yaban turpu peroksidaz ve tetrametilbenzidin, TMB'nin eklenmesi) üreticinin talimatlarında belirtildiği gibi gerçekleştirildi. 1 mol/l H₂SO₄ ile asitleştirildikten sonra nihai TMB reaksiyon ürününün absorpsiyonu 450 nm'de ölçüldü (referans dalga uzunluğu: 570 nm). Numunelerdeki TNF-a konsantrasyonu, standart sıra absorpsiyon verilerinden elde edilen regresyon denklemi temelinde hesaplandı.

Veri analizi

Her deney en az üç kez işlendi; XTT ve TNF-a tahlili, üç kopya halinde gerçekleştirildi. Şekillerde, sitotoksikite sonuçları aritmetik ortalama ortalamanın standart hatası (SEM) olarak verilmiştir.

TNF-a salımının sonuçları, tekli değerlerin aritmetik ortalama 7 standart sapmasına (SD) karşılık gelir. İstatistiksel anlamlılığın hesaplanması, elde edilen tüm deneysel verileri içermiştir. Bağımsız örneklem için Student t-testi kullanıldı. Sonuçlar t-testi gerekliliklerini karşılamadıysa Wilcoxon, Mann ve Whitney'e göre parametrik olmayan U-testi uygulandı. p<0.05 için değerler anlamlı kabul edildi.

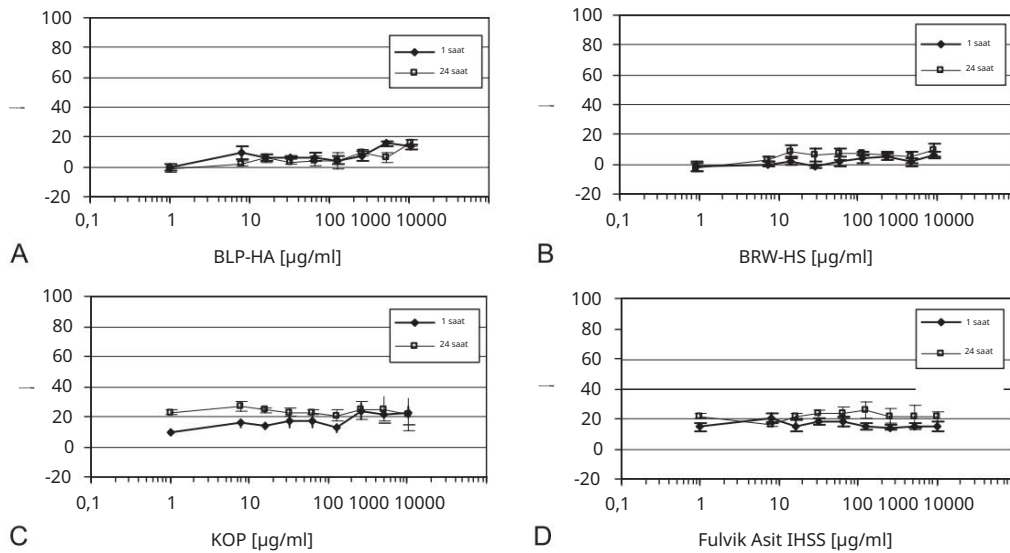
Sonuçlar ve tartışma

Araştırmaların ilk adımında, hüme maddelerin sitotoksitesisi, U937 hücrelerinin 1 ve 24 saat boyunca 1 ila 1000 mg/ml dereceli H₂S konsantrasyonlarına maruz bırakılmasıyla belirlendi. Sonuçlar, araştırmaların dört hüme asitten üçünü (BRW-HS, FA ve Na-KOP) hücreler tarafından iyi tolere edildiğini ve bu davranışın maruz kalma süresinden büyük ölçüde bağımsız olduğunu göstermektedir (Şekil 1A-D). 4500 mg/ml BLP-HA konsantrasyonları için zayıf bir sitotoksikite artış eğilimi gözlenebilse de, hiçbir durumda %20'lik bir sitotoksikite düzeyi aşılmamıştır. Bu nedenle, test maddelerinin önemli sitotoksik etkileri, TNF-a salım deneylerinde kullanılan konsantrasyon aralığı için geniş ölçüde hariç tutulabilir.

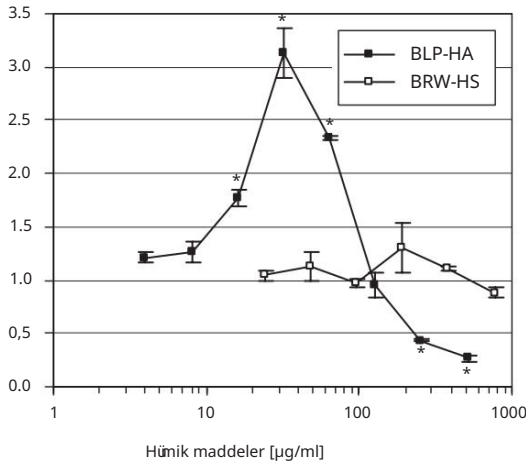
BLP-HA ve BRW-HS varlığında TNF-a salımı deneylerinin sonuçları, Şekil 2'de gösterilmektedir. BLP-HA, düşük konsantrasyonlarda (10-80 mg/ml) kullanıldığında, önemli bir artış gösterir. LPS ile uyarılmış, farklılaşmış U937 hücrelerinden TNF-a salımı.

Muamele edilmemiş hücrelerle karşılaştırıldığında, 32 mg/ml BLP-HA ile muamele edilmiş hücreler, 4 saatlik LPS stimülasyonundan sonra neredeyse üç kat TNF-a salımına neden olur. 100 mg/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda eğri aşağı doğru döner ve 512 mg/ml BLP-HA TNF-a salımını yaklaşık %80 oranında azaltır. BRW-HS durumunda, TNF-a salımını üzerinde önemli bir etki gözlenmemiştir (Şekil 2).

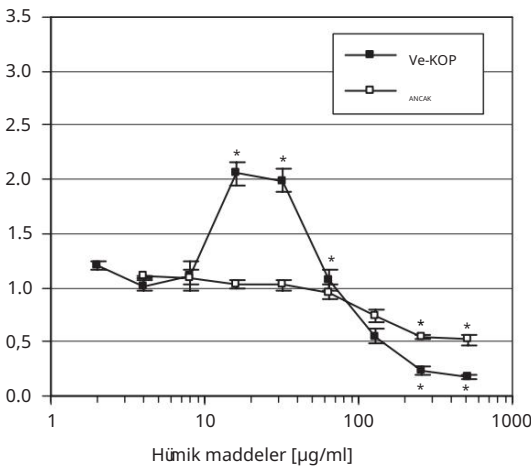
Sentetik HA benzeri polimer Na-KOP'un doz-yanıt eğrisi, BLP-HA'ninkine benzer bir seyir izler (Şekil 3). 10 ve 100 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda Na-KOP, TNF-a salımında iki kat artışa neden olurken, 100 mg/ml'den yüksek konsantrasyonlar TNF-a salımını yaklaşık 10 kat azaltır. HA ve Na-KOP'tan farklı olarak, FA düşük konsantrasyonlarda



Şekil 1. Altteich kara turba hüme asitlerinin (BLP-HA), Altteich kahverengi su hüme maddelerinin (BRW-HS), HA benzeri kafeik asit oksidasyon ürününün (Na-KOP) ve 1- ve sonrasında bir Finish fulvik asit preparatının sitotoksitesisi U937 hücrelerinin 24 saatlik tedavisi. Sitotoksikite, üç kopyalı en az üç bağımsız deneyin ortalama değerleri 7SEM ile temsil edilir.



Ş ekil 2. Alteich siyah turba hümik asitlerinin (BLP-HA) ve Alteich kahverengi su hümik maddelerinin (BRW-HS) farklılaş tırılmış , LPS ile uyarılan U937 hücrelerinden TNF-a salınımı üzerindeki etkisi (ortalama ± standart sapma, n=3). Sonuçlar, *pp0.05 ile, LPS ile uyarılmış , ancak HS ile tedavi edilmemiş hücrelerin TNF-a salınımı olarak ifade edilir. Gerçekleş tirilen üç (BRW-HS) veya dört (BLP-HA) deneyini temsil eden bir deneyin verileri gösterilmektedir.



Ş ekil 3. Kafeik asit oksidasyon ürününün (Na-KOP) ve bir Finish fulvik asit preparasyonunun (FA) farklılaş tırılmış , LPS ile uyarılan U937 hücrelerinin (ortalama ± 7SD, n=3) TNF-a salınımı üzerindeki etkisi. Sonuçlar, *pp0.05 ile, LPS ile uyarılmış , ancak HS ile tedavi edilmemiş hücrelerin TNF-a salınımı olarak ifade edilir. Gerçekleş tirilen üç (FA) veya dört (Na-KOP) temsil eden bir deneyin verileri gösterilmektedir.

TNF-a salınımı, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda (4200 mg/ml) yarı yarıya azaltın (Ş ekil 3). LPS ile muamele edilmemiş hücrelerde hümik maddelerin iltihaplanmaya neden olan etkisi tespit edilememiş tir (veriler gösterilmemiş tir).

Bu çalış manın sonuçları göz önüne alındığında, hümik maddelerin LPS ile uyarılan insan U937 hücrelerini etkilediği açıktır. İlk kez, sentetik HA'nın yanı sıra doğal olarak meydana gelen HA'nın da etkili olabileceği gösterilmiş tir.

TNF-a salınımı üzerinde konsantrasyona bağlı ters etki. Bu tip etkiler farmakolojide iyi bilinir ve genellikle bimodal olarak adlandırılır (Desai ve diğerleri, 1973). Bu, düşük dozlarda aktif maddenin, örneğin bir immünomodülatörün, hedef hücreler (lenfositler, monositler, makrofajlar) üzerinde aktive edici bir etki gösterdiği, yüksek dozların ise genel olarak baskılayıcı bir etki gösterdiği anlamına gelir (Matar ve diğerleri, 2002; Lo'pez ve diğerleri, al., 2006).

Gözlemlerimiz , sentetik HA benzeri polimerlerden oluş an bir panelin AA kaskadının anahtar enzimi olan fosfolipaz A2 (PLA2) ile etkileş imini inceleyen Klingner'in (2002) deneysel verileriyle tutarlıdır . Enzimin düşük (0.1-1 mg/ml) tarafından güçlü bir şekilde uyarıldığı ve daha yüksek (410 mg/ml) HA konsantrasyonları tarafından normalleş tirildiği veya hafifçe inhibe edildiği bulundu, bu da fosfolipid metabolizmasında HA'nın modüle edici bir potansi olduğunu düş ündürür (Klocking ve Helbig, 2001).

HA'nın TNF-a salınımı üzerindeki bimodal etkisi özellikle ilgi çekicidir, çünkü sitokin mikrobiyal enfeksiyonlara karşı baş lı baş lık tepkisi reaksiyonlarını baş latmada kritik bir rol oynar. Ancak aş ırı TNF-a seviyeleri, romatoid artrit (El Bahri ve ark., 2007), osteoartrit (Iannone ve Lapadula, 2003), Morbus Crohn (Sartor, 2006), pelvik adezyonlar gibi birçok ağrılı inflamatuvar hastalık ile iliş kilidir . (Cheong ve diğerleri, 2002) ve kronik hava yolu iltihabı (Kim ve Remick, 2007). Mevcut çalış manın sonuçları, diğer TNF-a antagonistlerinin (örn. terapötik olarak kullanılan infliximab) aksine, BLP-HA ve KOP'un hem spesifik olmayan baş lı baş lık tepkisini (proinflamatuvar etki) hem de kontrolsüz yüksek TNF'den hücrelerin korunmasını destekleyebildiğini göstermektedir. TNF- α üretim (anti-inflamatuvar etki). BLW-HA'nın kayıtsız davranış ı ve FA'nın oldukça düşük anti-enflamatuvar etkisi, hümik maddeler arasındaki düşük moleküler kütleleri ve aktivite ile ilgili kimyasal yapılarındaki farklılıklardan (Klocking ve diğerleri, 2006) kaynaklanıyor olabilir . Bu iliş kililerin açıklanması, daha geniş bir doğal ve sentetik hümik maddeler paneli gerektirir ve daha fazla araş tırmanın konusu olmaya devam eder.

Test maddelerinin farklı kökenleri veya kullanılan hazırlama yöntemleri gibi TNF-a salınımındaki değiş ikliklerin diğer nedenlerinin sonuçlar üzerinde açıkça daha az etkisi vardır. Örneğin, Alteich turbasının BLP-HA'sı ve sentetik HA KOP'un, kökenleri ve hazırlanış ları oldukça farklı olsa da, TNF-a salınımı üzerinde benzer etkileri vardır. Aynı durum BRW-HA ve FA için de geçerlidir.

HA'nın U937 hücrelerinin TNF-a salınımını nasıl etkilediğinin mekanizması ş u ana kadar belirsizdir. HA'nın uyarıcı ve/veya inhibe edici etkisinin, HA'nın negatif yükü fonksiyonel grupları ile iliş kilili olabileceği tahmin edilebilir, çünkü diğer polianyonik bileş ikler de sitokin üretiminde değiş ikliklere neden olur. Chang ve ark. (1994) , farklı polianyonik bileş iklerin LPS ile aktive olan THP-1 hücrelerinde TNF-a üretimi üzerindeki etkisini karşı llaşt ırarak, sentetik polisülfatlanmış hyaluronik asit buldu.

süfat heksozamin molar oranı 3.9, güçlü bir TNF-a üretimi inhibitörüdür. Buna karşılık, kondroitin-4-süfatlar, keratin süfat, heparan süfat ve heparin gibi doğal polisüfatlanmış glikozaminoglikanlar, TNF-a üretimini inhibe edemedi veya kondroitin-6-süfat için gözlemlendiği gibi, onu önemli ölçüde artırdı. Heinzelmann ve Bosshart (2005), LPS ile uyarılan monositlerin polianyonik bileşiklere karşı artmış enflamatuar tepkisi için bir açıklama önermiştir.

Yazarlar, heparin veya dekstran süfat gibi süfatlanmış polisakkaritlerin, LPS bağlayıcı serum proteini (LBP) ile birleştiğini, LPS'nin yerini değiştirdiğini ve LPS'nin membran reseptörü CD14'e transferini hızlandırdığını ve böylece enflamatuar yanıtı arttırdığını bulmuşlardır. HA'nın anti-enflamatuar aktivitesi için olası bir açıklama sağlayan farklı bir hedef, Gau ve arkadaşları tarafından bulundu. (2000). İnsan göbek damarı endotel hücrelerinde (HUVEC) yapılan araştırmalar, HA'nın doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde önemli bir faktör olan NF-kappaB'nin LPS ile uyarılmış aktivasyonunu doza ve zamana bağlı bir şekilde baskıladığını ortaya çıkardı.

Sonuç olarak, sonuçlar ilk kez FA için bulunmayan U937 hücrelerinde LPS ile indüklenen TNF-a salınımı üzerinde HA'nın konsantrasyona bağlı bimodal etkisini göstermektedir. HS'nin biyoyumluluğu ile ilgili olarak sunulan sonuçlar, HS'nin normal LPS ile muamele edilmemiş insan hücrelerinde enflamasyona neden olan etkisine dair hiçbir belirti vermemektedir. Bununla birlikte, düşük HA konsantrasyonlarının LPS ile uyarılmış hücrelere TNF-a artırıcı etkisi, LPS'ye bağlı ve LPS'den bağımsız iltihaplanma modellerinde daha geniş bir doğal ve sentetik H2S panelinin daha ayrıntılı araştırmalarını gerektirir.

Referanslar

- Aiken, GR, 1985. Sudaki hümitik maddeler için izolasyon ve konsantrasyon teknikleri. İçinde: Aiken, GR, McKnight, DM, Wershaw, RL, MacCarthy, P. (Eds.), Toprak, Sediment ve Sudaki Hümitik Maddeler: Jeokimya ve İzolasyon. Wiley-Interscience, New York, s. 363-385 (IHSS 2002'den çevrimiçi olarak erişilebilir. International Humic Substances Society'ye Giriş /http://www.ihss.gatech.edu, 23 Ocak 2007).
- Baatz, H., 1988. Jinekolojide moor tedavisi. İçinde: Flaig, W., Goecke, C., Kauffels, W. (Eds.), Moor tedavisi - temel bilgiler ve uygulamalar. Ueberreuter, Viyana, Berlin, s. 161-168.
- Caron, E., Peyrard, T., Köhler, S., Cabane, S., Liautard, J.-P., Dornand, J., 1994. Live Brucella spp. U937'den üretilmiş fagositlerin enfeksiyonu üzerine tümör nekroz faktörü alfa atılımını indüklemeye başlangıçsız olma. Bağışıklık. 62, 5267-5274.
- Chang, NS, Intriери, C., Mattison, J., Armand, G., 1994. Sentetik polisüfatlanmış hyaluronik asit, tümör nekroz faktörü üretimini için güçlü bir inhibitördür. J. Lökosit Biol. 55, 778-784.
- Cheong, YC, Shelton, JB, Laird, SM, Richmond, M., Kudesia, G., Li, TC, Ledger, WL, 2002. IL-1, IL-6 ve Pelvik adezyonlu kadının peritoneal sıvısındaki TNF-a konsantrasyonları. Himm. Üreme 17, 69-75.
- Desai, KS, Li, KC, Angel, A., 1973. İnsünün hormonla uyarılan lipoliz üzerindeki bimodal etkisi: hücre içi 30,50- sıklık adenilik asit ve serbest yağ asidi düzeyleriyle ilişki. J. Lipid Res. 14 (6), 647-655.
- Dunkelberg, H., Kloeking, H.-P., Kloeking, R., 1997. U937 hücrelerinde ısı kaynaklı [3H]araştırma idonik asit salınımının hümitik asit benzeri polimerler tarafından baskılanması. Eczane. Toksikol. 80 (Ek III), 175-176.
- El Bahri, DM, Meddeb, N., Sellami, S., 2007. Romatoid artrit: tedavinin güncel durumu. Tunus. Med. 85, 1-8.
- Fan, H., Zingarelli, B., Peck, OM, Teti, G., Tempel, GE, Halushka, PV, Cook, JA, 2005. Lipopolisakkarit- ve gram-pozitif bakteri kaynaklı hüresel enflamatuar tepki: heterotrimerik rolü Hümitik proteinleri. Am. J. Physiol. Hücre Fizyol. 289, C293-C301.
- Gau, RJ, Yang, HL, Chow, SN, Suen, JL, Lu, FJ, 2000. Hümitik asit, NF kappaB aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla hücre yüzeyi adezyon proteinlerinin LPS ile indüklenen ekspresyonunu baskılar. Toksikol. Uygulama Eczane. 166, 59-67.
- Hanninen, KI, Kloeking, R., Helbig, B., 1987. Hümitik asit benzeri polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu. bilim Toplam Çevre. 62, 201-210.
- Heinzelmann, M., Bosshart, H., 2005. Heparin, lipopolisakkarit (LPS) bağlayıcı proteine bağlanır, LPS'nin CD14'e transferini kolaylaştırır ve periferik kan monositlerinin LPS kaynaklı aktivasyonunu artırır. J. Immunol. 174, 2280-2287.
- Helbig, B., Kloeking, R., Wutzler, P., 1997. Hümitik asit benzeri polimerlerin ve bunların o-difenolik başlangıç bileşiklerinin anti-herpes simpleks virüs ütop 1 aktivitesi. Antiviral Kimya kimyager. 8, 265-273.
- Iannone, F., Lapadula, G., 2003. Osteoartritin patofizyolojisi. Yaşlanma Kliniği Tecrübe. Res. 15, 364-372.
- Inglot, AD, Zielin'ska-Jencylik, J., Piasecki, E., 1993. Topra turba preparasyonu (TPP), insan periferik kan lökositlerinde interferon ve tümör nekroz faktörü üretimini indükler. Ark. immünol. orada. Tecrübe. (Varış ova) 41, 73-80.
- Kim, J., Remick, DG, 2007. Astım tedavisi için tümör nekroz faktörü inhibitörleri. Curr. Alerji Astım Rep. 7, 151-156.
- Kinne, M., Ullrich, R., Liers, C., Hofrichter, M., Schoenherr, JI, Morrow, R., Henderson, J., 2005. Farklı kökenlerden hümitik maddelerin izolasyonu ve kromatografik karakterizasyonu. İçinde: 2. Tıp, Veterinerlik ve Vücut Bakımında Turba ve Hümitik Madde Müstahzarları Sempozyumu Bildiri Kitabı. Bad Langensalza, Almanya, basında.
- Kleinschmidt, J., 1988. Romatizmal hastalıklarda moortedavi. İçinde: Flaig, W., Goecke, C., Kauffels, W. (Eds.), Turba tedavisi - temel bilgiler ve uygulamalar. Ueberreuter, Viyana, Berlin, s. 216-224.
- Klingner, J., 2002. Doğal olarak oluşan hümitik asitlerin ve sentetik fenolik vücut polimerlerinin ve bunların başlangıç malzemelerinin fosfolipaz A2 aktivitesi üzerindeki etkisine ilişkin tarama çalışmaları (tez). Jena Üniversitesi Tıp Fakültesi.

- Klocking, R., Helbig, B., 2001. Hüyük maddelerin tıbbi yönlere ve uygulamaları. İçinde: Hofrichter, M., Steinbuchel, A. (Eds.), Biopolymers, Vol. 1: Lignin, Hüyük Maddeler ve Kömür. Wiley-VCH, Weinheim, s. 379–392.
- Klocking, R., Hofmann, R., Mucke, D., 1968. Hayvanlarda humatların antiflojistik aktivitesi üzerine deneysel alış malar. İlaç. Forsch (Drug Research) 18, 941–942 (Almana).
- Klocking, H.-P., Dunkelberg, H., Klocking, R., 1997. Hüyük asit türündeki maddeler, U937 hücrelerinin ısı kaynaklı araşı donik asit salınımını önlere. İçinde: Müller, WEG (Ed.), Denizde Çevresel Kirliliğın İlenmesinde Modern Yönlere. Verlag der Akademie gemeinnutziger Wissenschaften zu Erfurt, Erfurt, s. 156–158.
- Klocking, H.-P., Jelinek, A., Klocking, R., 1998. Antikoagulan ve profibrinolitik özelliklere sahip sülfatlanmış karbonhidratların sitotoksitesisi. eczane Eczane. Letonya 8, 72–74.
- Klocking, R., Helbig, B., Schötz, G., Schacke, M., Wutzler, P., 2000. p-difenolik başlangıçtan türetilen sentetik hüyük asit benzeri polimerlerin anti-HSV-1 aktivitesi Bileşikleri. Antiviral Kimya kimyager. 13, 241–249.
- Klocking, R., Kühn, S., Klocking, H.-P., 2004. Doğal turba humik asitleri ve para-aminobenzoik asidin (PABA) UV-B koruyucu etkisinin karşılaştırılması. İçinde: Paivänen, J. (Ed.), Turbalıkların Wise Use of Peatlands, Cilt. 1. 12. Uluslararası Turba Kongresi Tutanakları, Tampere, Finlandiya, s. 421–425.
- Klocking, R., Helbig, B., Pörschmann, J., Wutzler, P., 2006. Hüyük maddelerin antiviral gücü İçinde: Frimmel, FH, Abbt-Braun, G. (Eds.), Hüyük Maddeler—Yapıyı İşlevlere Bağlamak. Uluslararası Hüyük Maddeler Derneğinin 13. Toplantısı Tutanakları, 30 Temmuz– 4 Ağustos 2006, Karlsruhe, Almanya, cilt. I, s. 397–400.
- Klocking, R., Helbig, B., Kinne, M., Kleiner, C., Gorecki, T., Pörschmann, J., Podgorski, D. Cooper, WT, Dihidroksillenmiş fenilpropanoidlerden yapılan sentetik (ekirdek) hüyük maddelerin karakterizasyonu. İçinde: Perminova, IV, Kulikova, NA (Eds.), Moleküler Anlayıştan Hüyük Maddelerin Yenilikçi Uygulamalarına. Uluslararası Hüyük Maddeler Derneğinin 14. Toplantısı Tutanakları, 14–19 Eylül 2008, Moscow, Saint Petersburg, Rusya, cilt. I, s. 95–98.
- López, AS, Alegre, E., Díaz, A., Mugueta, C., González, A., 2006. Enzimatikte nitrik oksit bimodal etkisi insan monositik hücrelerinde indoleamin 2,3-dioksijenaz aktivitesi. immünol. Letonya 106, 163–171.
- Matar, P., Rozados, VR, Gervasoni, SI, Scharovsky, GO, 2002. Bir sıçan metastatik lenfoma modelinde tek bir düşük doz siklofosamid tarafından indüklenen Th2/Th1 değışimi. Kanser İmmünoloji Bağışıklık. 50, 588–596.
- Perdue, M., 1985. Hüyük maddelerin asidik fonksiyonel grupları. İçinde: Aiken, GR, McKnight, DM, Wershaw, RL, MacCarthy, P. (Eds.), Toprak, Sediment ve Sudaki Hüyük Maddeler: Jeokimya ve İzolasyon. Wiley Interscience, New York, s. 494–526.
- Pörschmann, J., Gorecki, T., Helbig, B., Klocking, R., 2003. Farmakolojik olarak etkili sentetik hüyük maddelerin kimyasal karakterizasyonu. İçinde: Klocking, R., Klocking, H.-P. (Eds.), Tıpta Turba Müdahazları, Veterinerlik ve Vücut Bakımı. Verlag der Akademie gemeinnutziger Wissenschaften zu Erfurt, Erfurt, s. 103–124.
- Riede, UN, 2000. Hüyük maddelerin epidermis hücreleri üzerindeki proinflatuar etkisi. 53. DGGG Kongresi – Alman Jinekoloji ve Obstetrik Derneğinin 13-16 Haziran 2000, Münih, Almanya. /http://www.thieme.de/abstracts/gebfra/abstracts2000/fr_content.html s.
- Roberts, FA, Richardson, GJ, Michalek, SM, 1997. Porphyromonas gingivalis ve Escherichia coli lipopolisakaritlerinin mononükleer fagositler üzerindeki etkileri. bulaş tırmak. bağışıklık. 65, 3248–3254.
- Sartor, RB, 2006. Hastalık mekanizmaları: Crohn hastalığı ve ülseratif kolitin patogenezi. Nat. klinik Pratik Gastroenterol. Hepatol. 3, 390–407.
- Schewe, Ch., Klocking, R., Helbig, B., Schewe, T., 1991. Polifenollerin antiviral polimerik oksidasyon ürünlerinin lipoksijenaz önleyici etkisi. Biyomed. Biyokimya. Açıkta 50, 299–305.
- Taugner, B., 1963. Sodyum humat salisilik asit banyosu üzerinde hayvanlarda deneysel alışmalar. Arzneim. forsch. (İlaç Araş tırması) 13, 329–333 (Almana).
- Young, KD, LeBoeuf, EJ, 2000. Turba humik asidinde ve sucul fulvik asitte cam geçiş davranış ı. çevre. bilim Teknoloji 34, 4549–4553.
- Zeck-Kapp, G., Nauck, M., Riede, UN, Block, L., Freudenberg, N., Seubert, B., 1991. Proinflatuar hücre sinyalleri olarak düşük moleküler hüyük maddeler. Sür. Almanca Ges. Pathol. 75, 504.