

Oksihumatın İmmün Sistemi Uyarıcı Özelliklerinin Araştırılması

Gisela Käthe Joone'a , John Dekerb , ve
Constance Elizabeth Jansen van Rensburg,*

Pretoria Üniversitesi Tıp Bilimleri Fakültesi, Farmakoloji Bölümü,
Posta Kutusu 2034, Pretoria, 0001, Güney Afrika. Faks: +27-12-3 19 24 11.

E-posta: cmedlen@postillion.up.ac.za b
Enerkom (Pty) Ltd, Pretoria, Güney Afrika * Yazışma ve

yeniden baskı talepleri için yazar Z. Naturforsch. 58c , 263-267

(2003); alınan 10 Eylül/22 Ekim 2002 Bitümlü kömürü, kontrollü ıslak oksidasyon ve ardından

baz arıtma ile oksihumat adı verilen suda çözünür bir hümeta dönüştürmek için benzersiz bir süreç geliştirildi.
Oksihu matenin lenfositlerin proliferatif tepkisi üzerindeki etkileri in vitro ve ex vivo olarak incelenmiştir.

Oxihumate, fitohaemaglutinin ile uyarılan insan lenfositlerinin proliferatif tepkisini 20 µg/ml'lik bir konsantrasyondan ve yukarısına kadar arttırdı. Bu yanıt, HIV ile enfekte hastalardan alınan lenfositler durumunda daha da çarpıcıydı ve in vitro ortamlarla sınırlı değildi, çünkü benzer etkiler, HIV pozitif bireylere günde 4 g oksihumatın toksik olmayan bir dozunun uygulanmasını takiben ex vivo olarak gözlemlendi. iki haftadır. Mekanistik çalışmalar, lenfositlerin proliferatif tepkisinin oksihumat tarafından uyarılmasının, artan IL-2 üretimi ve ayrıca azalan IL-10 üretimi ortamında IL-2 reseptörünün ekspresyonu ile ilişkili olduğunu ortaya koydu. Bu nedenle Oxihumate, bağışıklığı baskılanmış hastaların tedavisi için umut vaat etmektedir.

Anahtar kelimeler: Oksihumat, İmmunostimülasyon, IL-2

Giriş

Humik maddeler doğada yaygın olarak bulunur. Esas olarak aşırı derecede bozulmuş turbada, fakat aynı zamanda organik materyallerin ve mikroorganizmaların mevcut olduğu veya mevcut olduğu tüm doğal ortamlarda meydana gelirler (Visser, 1973; Hartenstein, 1981). Turba özütleri eski zamanlardan beri terapötik banyolarda uzun yıllardır çeşitli durumların tedavisi için kullanılmaktadır (Brandt, 1964; Eichelsdörfer, 1976; Klöcking, 1994). Turbanın antiseptik özellikleri ilk olarak Birinci Dünya Savaşı sırasında enfeksiyonu önlemek için doğrudan yaralara uygulandığında fark edildi (Haanel, 1924).

Daha yakın zamanlarda, humat Von Willebrand hastalığının tedavisinde kullanılmıştır (Lopez-Ferandez ve diğerleri, 1992). Hastalar 35 mg/kg vücut ağırlığı infüzyonu ile tedavi edilmiş ve bundan sonra mal faktör VIII seviyelerine ulaşamamıştır.

Bitümlü kömürü kontrollü ıslak oksidasyonla dönüştürmek için benzersiz bir süreç geliştirilmiştir, ardından oksihumat (oksihumik maddenin potasyum tuzu) adı verilen suda çözünür humatlara temel işlem uygulanır.

asit) (Bergh ve diğerleri, 1997). Kömürden türetilen hümitik ve fulvik asidin antimikrobiyal olarak olası uygulaması, Cloete ve diğerleri tarafından tarif edilmiştir. (1990) ve Van Rensburg ve diğerleri. (2000) kömürden türetilen fulvik asidin anti inflamatuvar özellikleri yakın zamanda Van Rensburg ve ark. (2001) ve Snyman ve diğerleri. (Basında).

100 µg/ml amonyum humat (hümitik asidin amonyum tuzu) konsantrasyonundaki antiviral özellikler, in vitro olarak Thiel ve diğerleri tarafından tarif edilmiştir . (1981), bu ajanın herpes virüsünün neden olduğu deri hastalıkları için topikal bir tedavi olarak başarılı bir şekilde kullanılmasıyla sonuçlanmıştır (Klöcking ve diğerleri, 1983). Schneider ve ark. (1996), hidrokinondan türetilen sentetik hümat analoglarının anti-HIV aktivitesi hakkında rapor verdi. Bu bileşikler, MT-2 hücrelerinin HIV-1 enfeksiyonunu , 50-300 ng/ml'lik etkileyici derecede düşük bir IC50 ile inhibe etti. HIV partiküllerinin enfektivitesi, virüs girişinin bir V3 döngü aracılı aşamasının müdahalesi ile inhibe edildi. Oksihumat ile benzer sonuçlar bulunmuştur (Van Rensburg ve diğerleri, 2002). Bu çalışmada oksihumatın insan lenfosit fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırdık.

Kısaltmalar: PHA, Fitohemaglutinin A; MNL, mononükleer lökositler.

Malzemeler ve yöntemler

oksihumat

Oxihumate, Enerkom (Pty) Ltd, Pretoria, Güney Afrika tarafından su içinde %1'lik bir çözelti halinde sağlandı. Oksihumatın elementel bileşimi için ortalama değerler karbon, hidrojen ve nitrojen için sırasıyla %40, %2,5 ve %1 iken oksitlenmiş kömürden elde edilen hümik asidin yaklaşık moleküler ağırlığı 57 ile 70 kD arasındadır (Piccolo ve ark., 2000).

Mononükleer lökositler (MNL)

Bunlar daha önce tarif edildiği gibi (Anderson ve diğerleri, 1993) ya sağlıklı yetişkin insan gönüllülerden ya da HIV ile enfekte bireylerden (bir hastalık ile CD4 sayısı 209 ve 504 X 106 /l arasında) tedaviden önce veya her gün ağızdan alınan 2 haftalık plasebo, 4 g veya 6 g oksihumat tedavisinden sonra. Bu hastalar, HIV ile enfekte bireylerde oksihumatın terapötik etkinliğini değerlendirmek için bir pilot çalışmaya katılmıştır. Bu deneme, Dünya Tabipler Birliği Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Pretoria Üniversitesi ve Güney Afrika İlaç Kontrol Konseyi tarafından belirlenen tüm etik ve yasal standartlar takip edildi.

Hücreler daha sonra ya komple RPMI 1640 ortamında (100 ug/ml'de %1 glutamin, penisilin ve streptomisin ve Bio Whittaker, Walkers ville'den elde edilen %10 ısı ile inaktif edilmiş fetal dana serumu ile desteklenmiş) 2 ¥ 106 /ml'ye yeniden süspanse edildi. Maryland) veya 2 ¥ 106 /ml'ye yeniden süspanسیون haline getirmeden önce yapışık hücreleri süspanسیونdan çıkarmak için 30 dakika boyunca 5 ml'lik doku kültürü şişelerinde tam medyum içinde inkübe edildi .

Mitojenle aktive olan MNL proliferasyonu

Elli mikrolitre MNL süspanسیونu (1 ¥ 105 hücre/oyuk), mikrotiter kültür plakalarının (96 kuyu) kuyularındaki 110 ul tam RPMI 1640 ortamına, ardından 20 ul çeşitli oksihumat konsantrasyonlarına (5-100 ug/ml) ilave edildi. ve 20 ul mitojen fitohemaglutinin (PHA, 5 ug/ml nihai konsantrasyon). Oksihumat ve/veya mitojen içermeyen kontrol sistemleri dahil edildi ve tüm kuyucukların nihai hacimleri ayarlandı.

200 µ l'ye kadar. 72 saatlik inkübasyondan sonra (%5 CO2 atmosferinde 37 ° C) , lenfosit proliferasyonunun boyutu MTT [3-(4,5-dime thylthiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromide] ile test edildi. sadece canlı hücreleri saptayan reaktivite (Mos man, 1983). Plakalar, 540 nm'lik bir test dalga boyu ve 620 nm'lik bir referans dalga boyu kullanılarak bir Ceres UV 900 mikro-ELISA okuyucusunda okundu.

Sitokinlerin ölçümü

Bu deneyler yukarıda açıklandığı gibi kuruldu. Sağlıklı donörlerden elde edilen MNL süspanسیونları (1 ml), 5 ml plastik tüplerde 72 saat boyunca 60, 80 ve 100 ug/ml oksihumate ile PHA (5 ug/ml) varlığında işleme tabi tutuldu ve süpernatantlar toplandı ve depolandı. Amersham TM'den (Amersham International Plc, Buckinghamshire, İngiltere) ilgili Biotrak TM insan ELISA sistemleri kullanılarak müteakip IL-2 ve IL-10 tespiti için -70 ° C.

CD25 ifadesi

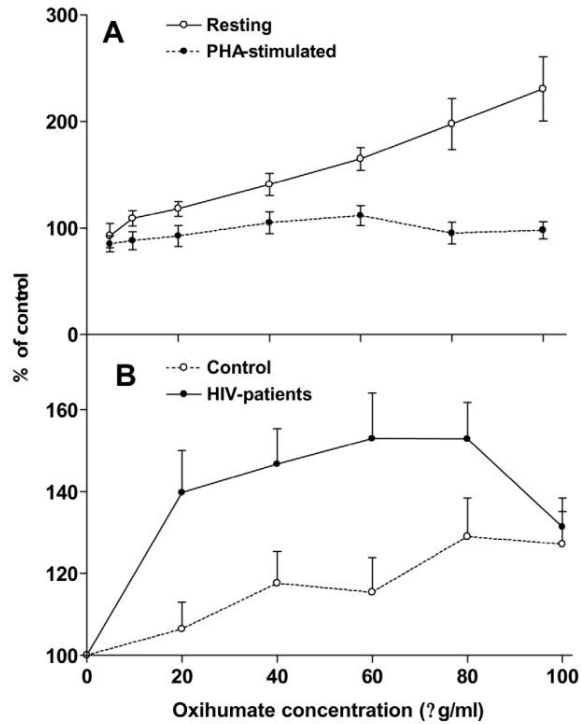
Sağlıklı donörlerden elde edilen MNL süspanسیونları, 72 saat boyunca 100 ug/ml oksihumat içeren veya içermeyen PHA (5 ug/ml) varlığında işleme tabi tutuldu ve CD25'e karşı FITC-konjügel monoklonal antikor ile ölçülen CD25 ekspresyonu. Akış sitometrik analizi, 488 nm hava soğutmalı argon lazeri ile donatılmış bir Coulter Epics XL-MLC akış sitometresi (Coulter Corp, Miami, Florida, ABD) kullanılarak yapıldı.

Sonuçlar

MNL çoğalması

Oksihumatın, 100 ug/ml'lik bir konsantrasyona kadar istirahat halindeki lenfositler üzerinde bir etkisi olmamıştır, ancak PHA ile uyarılan monositlerden arındırılmış lenfositlerin proliferatif tepkisini 20 ug/ml'de ve yukarı doğru, doza bağlı bir şekilde artırmıştır (Şekil 1A). Monosit zengin MNL kullanıldığında da benzer etkiler görüldü (Şekil 1B). Bu yanıt, HIV ile enfekte hastalardan alınan monosit bakımından zengin lenfositler (MNL) durumunda daha da çarpıcıydı (Şekil 1B).

HIV ile enfekte bireylerde MNL'nin PHA ile uyarılmış proliferasyonunda önemli (p < 0.05) artışlar, aşağıdakileri ex vivo olarak da gözlemlendi:



Şekil 1. Çeşitli oksihumate konsantrasyonları ile 72 saatlik bir tedavinin [A] dinlenme ve fitohaemagglutinin (PHA) ile uyarılan, monositlerden arındırılmış, insan lenfosit proliferasyonu ve [B] PHA ile uyarılan mononükleer lenfosit (MNL) üzerindeki etkileri (normal donörlerden ve HIV ile enfekte bireylerden alınan kültürler). Sonuçlar, 5-18 farklı deneyin kontrol \pm SEM yüzdesi olarak ifade edildi.

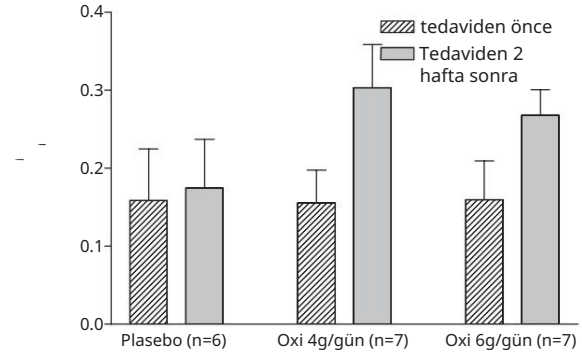
plasebo ile tedavi edilen gruba kıyasla 2 hafta boyunca günde 4 g (ancak 6 g değil) oksihumate uygulaması (Şekil 2).

IL-2 Sırrı

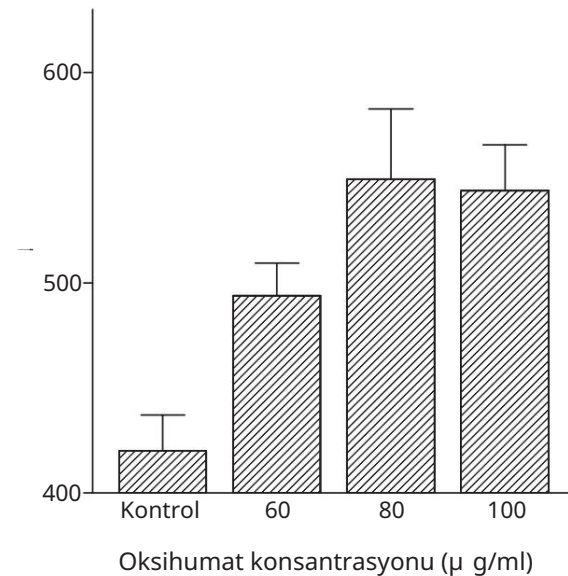
Oxihumate, test edilen üç konsantrasyonun hepsinde (Şekil 3) PHA ile uyarılmış MNL tarafından IL-2 salgılanmasını önemli ölçüde artırdı ($p < 0.05$).

IL-10 Sırrı

Oxihumate tedavisinin, PHA ile uyarılmış MNL tarafından IL-10 salgılanması üzerindeki etkileri, Şekil 4'te gösterilmektedir. Oxihumate, her üç konsantrasyonda da IL-10 salgılanmasını, dinlenme halindeki hücrelerde gözlemlenen seviyeye kadar azalttı ($p < 0.001$).



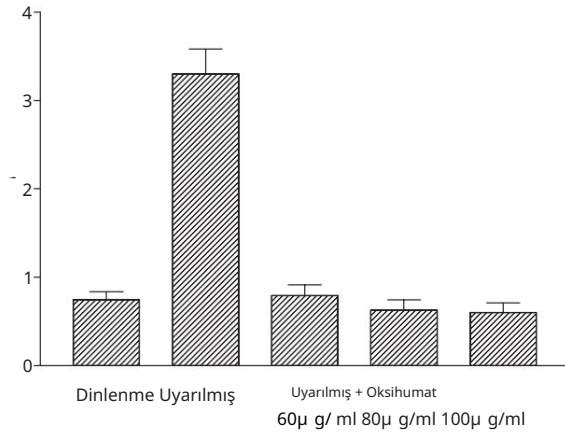
Şekil 2. HIV-pozitif bireylerin iki haftalık oksihumate tedavisinin fitohaemagglutinin ile uyarılan mononükleer lenfosit kültürleri üzerindeki ex vivo etkileri.



Şekil 3. Çeşitli konsantrasyonlarda oksihumate'nin 72 saatlik bir muamelesinin fitohaemagglutinin ile uyarılan mononükleer lenfosit kültürleri tarafından IL-2 üretimi üzerindeki etkileri. Sonuçlar, 4 farklı deneyin ortalama \pm SEM'si olarak ifade edildi.

CD25 ifadesi

Oxihumate (100 µg/ml'de), IL-2 reseptörü CD25'in PHA ile uyarılmış MNL tarafından ekspresyonunu önemli ölçüde artırdı ($p < 0.05$), ancak istirahat MNL'de CD25 seviyeleri üzerinde hiçbir etkisi olmadı. PHA ile uyarılan MNL için kontrol değerleri (medyan) $17,3 \pm 0,3$ iken, 100 µg/ml oksihumate ile tedavi edilen MNL için değerler $27,6 \pm 0,2$ idi.



Şekil 4. Çeşitli oksihumat konsantrasyonlarının 72 saatlik bir muamelesinin fitohemaglutinin ile uyarılan mononükleer lenfosit kültürleri tarafından IL-10 üretimi üzerindeki etkileri. Sonuçlar, 4 farklı deneyin ortalama \pm SEM'si olarak ifade edildi.

Tartışma

HIV hastalığı, artan bir T-hücre döngüsü oranı ile ilişkili olmasına rağmen, CD4+ hücre sayılarının kaybı, hücresel bağışıklık fonksiyonunun sonuçta meydana gelen kayıpla yeniden doldurulma kapasitesini aşmaktadır (Losso ve ark., 2000). T hücresinden türetilen bir sitokin olan interlökin-2'nin (IL-2) bir işlevi, T hücresi büyümesini ve olgunlaşmasını teşvik etmektir. IL-2 in vitro viral replikasyonu azaltmaya da (Kovacs ve diğerleri, 1996), T-hücresinin proliferasyonunu artırarak HIV ile enfekte bireylerde virüs kaynaklı CD4+ hücre kaybını önleyebilir. Yüksek düzeyde aktif anti retroviral terapi (HAART) kombinasyonu ile birlikte verilen IL-2, tek başına HAART'a kıyasla ortalama CD4 sayımlarında çarpıcı artışlara neden olur (Davey ve diğerleri, 2000; Shearer ve diğerleri, 1998).

Kömürden elde edilen suda çözünür bir humat olan oksihumat, proliferatif tepkiyi arttırdı.

20 µg/ml ve üzeri seviyelerde PHA ile uyarılan MNL ve monositler arındırılmış insan lenfositleri. Bu yanıt, HIV ile enfekte hastalardan alınan lenfositler durumunda daha da çarpıcıydı ve bu nedenle in vitro ortamları sınırlı değildi. Benzer etkiler, iki hafta boyunca HIV pozitif bireylere günde 4 g oksihumat uygulanmasının ardından ex vivo olarak gözlemlendi. Bu artış, artan IL-2 üretimine ve ayrıca lenfositler üzerinde IL-2 reseptörünün (CD25) ekspresyonuna bağlanabilir. Bu nedenle oksihumat, TH1 hücrelerinin (IL-2 üreten hücreler) aktivitesini artırırken aynı zamanda TH2 ile ilişkili bir sitokin olan IL-10'u azaltır. Bazı HIV-pozitif bireylerin normal TH1 tipi yanıtları sürdürme yeteneği, bu hastaların hayatta kalması üzerinde uzun vadeli koruyucu etkilere sahiptir, çünkü hastalığın ilerlemesi TH1'den TH2'ye sitokin kaymasına atfedilir (Shearer ve diğerleri, 1998; Altfeld ve diğerleri, 2000).

Oxihumate bu nedenle hem immüno-uyarıcı hem de anti-viral aktiviteye sahiptir (Van Rensburg ve diğerleri, 2002) ve sub-kronik veya akut oral veya dermal maruz kalma sırasında deney hayvanlarında ölçülebilir herhangi bir toksisite üretmedi (İlerleme Raporu: Biochon (Pty) Ltd, Pretoria, Güney Afrika, Temmuz 1999), iki hafta boyunca günde 8 g'a kadar oral dozlarla tedavi edilen HIV ile enfekte bireylerde ölçülebilir herhangi bir toksisite üretmedi (Botes ve diğerleri, 2002). Bir bileşikteki özelliklerin bu kombinasyonu, benzersiz görünmektedir ve HIV ile enfekte olanlar gibi bağışıklığı baskılanmış hastalarda daha fazla değerlendirmeyi hak etmektedir.

Teşekkür Bu çalışma,

Ener kom (Pty) Ltd'den alınan bir hibenin yanı sıra Ulusal Araştırma Vakfı ve Ticaret ve Sanayi Departmanı'nın Sanayi için Teknoloji ve İnsan Kaynakları Programlarından alınan bir hibe ile desteklenmiştir.

Altfeld M., Addo MM, Kreuzer KA, Rockstroh JK, Lopez-Fernandez MF, Blanco-Lopes MJ, Castineira Dumoulin FL, Schliefer K., Leifeld L., Sauerbruch MP ve Batlle J. (1992), Ek kanıt için alıntılar T., ve Spent (1991) 2/ye Kılıf ve HIV enfeksiyon hastalarında periferik kanında saptandı- Von Willebrand faktörünün faktöre normallik değeri. *Am. J. Hematol.* 40:207-217. **Manzoni, C. et al.** (1993) HIV enfeksiyonu koşullar altında enzim bağımlı immünosorbent tahlili Losso MH, Belloso WH, Emery S., Benetucci JA ile değil. *J. Acquir. bağışık.*

23, 287-294. Cahn PE, Lasala MC, Lopardo G., Salomon H., Defec. Syndr. Saracco M., Nelson E., Law MG, Davey RT, Allende MC ve Lane HC (2000), A randomized, Anderson R., Smit MJ ve Van Rensburg CEJ (1993), Lizofosfolipid aracılı Na+ inhibisyonu, kontrollü, K+-adenozin trifosfaz dozlarını karşılaştıran faz II denemesi, insan immün yetmezliği *Mol. Eczane.* 44, 605-619. CD4+ hücre sayımı olan *Virüs ve Enfeksiyon* 11:181-184. Dekker J.,

sma LM ve Mienie LJ (1997), Non-katalitik oksidasyon- Mosman T. (1983), Oksijenli su-bulamaç kömürün hücresel tarihlenmesi için hızlı kolorimetrik tahlil: tanımlama- büyüme ve hayatta kalma: fulvik asitler için 1991 yılında yapılan bir toplantıda sunulan sonuçlar. *Environ. Health Perspect.* 99:65-62.

Botes ME, Dekker J ve Van Rensburg CEJ (Piccolo A, Conte P ve Cozzolino A (2000), Differ press), Yüksek performanslı boyut dışlama kroma ile enfekte hastalarda HIV'lerde oral oksihumat ile bir faz I denemesi. *Environ. Health Perspect.* 108:1064-1068. **Dejager, J. et al.** (1996) HIV enfeksiyonunun polimerlerin tedavisi. İçinde: Humik Maddeler Omurga ve eklem için kullanılması. *Biochim. Biophys. Acta* 1282:145-150.

H., Cronje IJ ve Dekker J. (1990), wall, UK. Endüstriyel bakterisitler olarak oksitlenmiş kömür ürünleri. Schneider J., Weis R., Manner C., Kary B., Werner A., Seubert BJ ve Çevresel Biyoteknoloji Sempozyumunun Başlatılması. New Orleans, Louisiana, USA (1996), Ürünlerin biyolojilerine ve kullanım alanlarına ilişkin bilgiler. *Environ. Health Perspect.* 104:3-5 Aralık. hidrokinondan türetilmiştir: inhibisyon mekanizması.

Davey RT, Murphy RL, Graziano FM, Boswell Viroloji. 218, 389-395. SL, Pavia AT, Cancio M., Nadler JP, Chait DG, Shearer GM ve Clerici M. (1998), Sitokin profilleri Dewar RL, Sahner DK, Duliege AM, Capra'da HIV tip 1 hastalık ve korunma. *AIDS Res.* WB, Leong WP, Giedlin MA, Lane HC ve Hum. Retrovirüsler. 14, 149-152. Kahn JO (2000), İmmünolojik ve virolojik etkiler Snyman JR, Dekker J., Malfeld SCK, ve Van of subkutan interlökin 2 ile kombinasyon halinde Rensburg CEJ (basımda), Antiretroviral tedaviyi değerlendirmek için bir pilot çalışmada: Amer. J. Hygiene, kontrollü ve etkinliği. *Environ. Health Perspect.* 108:284, 183-189. atopik gönüllülerde asit. İlaç Geliştirme Arş.

Eichelsdörfer D. (1976), Tıpta Moor. İçinde: Thiel KD, Helbig B., Klöcking R., Wurtzer P., Sprössig moor and peat science (K. Göttlich, ed.). Schweizer- M., ve Schweizer H. (1981), Bart'ın Stuttgart'taki Karbonatlı kömürün (1974) tıbbi kullanımı. *Environ. Health Perspect.* 55:1-5. İçinde: Madenler Yayım no 614, Can. Bölüm Madenler, Ottawa. tip 1 (1981) 2/ye Kılıf ve HIV enfeksiyonu hastalarında periferik kanında saptandı- Von Willebrand faktörünün faktöre normallik değeri. *Am. J. Hematol.* 40:207-217.

zasyon. *Bilim.* 212, 743-749. Klöcking R. (1994), Potansiyel terapötikler olarak hümit maddeler. İçinde: Küresel Çevredeki Hümit Maddeler ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri (Senesi N. ve Miano TM, ed.). Elsevier Science BV Amster- Van Rensburg CEJ, Malfeld SCK ve Dekker J. baraj, Hollanda. (2001) Oksifulvik asidin topikal uygulaması, farelerde Klöcking R, Sprössig M, Witzler P, Thiel KD ve kutanöz immün yanıtı baskılar. *Drugs* 62, 288-292. **Dejager, J. et al.** (1996) HIV enfeksiyonunun polimerlerin tedavisi. İçinde: Humik Maddeler Omurga ve eklem için kullanılması. *Biochim. Biophys. Acta* 1282:145-150.

Kovacs JA, Vogel S., Albert JM, Falloon J., Davey (2000), Antimikrobiyal RT Jr.'in in vitro araştırması, Walker RE, Polis MA, Spooner K., Oksifulvik asidin met-aktivitesi. *J. Antimikrob. kimyager.* dana JA, Baseler M., Fyfe G. ve Lane HC (1996), 46, 853-854.

Hastalarda interlökin-2 infüzyonunun kontrollü denemesi Visser SA (1973), İnsan immün yetmezlik virüsü ile enfekte olmuş hümitlerin bazı biyolojik etkileri. *Sıçandaki N. asitler.* *Açta Biol. Med. mikrop. Grup* 31, İng. *J. Med.* 335, 1350-1356. 569D581.