



Turba Hümik Asitleri. Eritrositlerde Fiziko-Kimyasal Özellikler ve Biyolojik Aktivite

Nina Melnikova*^a, Olga Soloveva^a, Olga Vorobyovaa^a, Anna Solovyeva^a, Peter Peretyaginb^b, Natalya Didenkov^c, Korob'dan Valentina^d.

^a Farmasötik kimya bölümü, Nizhny Novgorod Devlet Tıp Akademisi, Minin sq., 10/1, Nizhny Novgorod, Rusya.

^b Nizhny Novgorod Halk Sağlığı Travmatoloji ve Ortopedi Araştırma Enstitüsü Rusya Federasyonu Bakanlığı, Verhne Voljskaya naberejnaya, 18, Nizhny Novgorod, Rusya.

*Sorumlu yazarın E-posta adresi: melnikovanb@gmail.com

Geliş Tarihi: 05-06-2017; Revize: 20-07-2017; Kabul tarihi: 13-08-2017.

SOYUT

Turbadan sulu etanol çözeltisiyle ekstrakte edilen hümik polielektrolitlerin (HPE) özellikleri - hem fulvik asitler (FA) hem de hümik (HA) ve fulvik asit karışımı IR-, UV-vis-, AA-spektroskopileri ve titrasyon kullanılarak incelenmiştir. HPE'nin Ca(OAc)₂, NaOAc ve NaOH çözeltileri ile titrasyon karakteristiği, fulvik asitler için Cu (7,6) > Zn (5,6) > Ca (4,3) > Fe (3,1). Kompleksleşmeye sadece karboksilik ve fenolik grupları değil, kinoid ve amid grupları da katkıda bulunabilir. Laktat dehidrojenaz ile katalize edilen enerji metabolizması ve gelişmesi, malonik dialdehit seviyesinin doza bağlı azalması (%30-70) ile karakterize olan lipoperoksidasyonun azalması ve SOD aktivitesinin artması in vitro sıçan kanı ile tahmin edilmiştir.

IR spektrumları na göre FA ve HPE, alkol ve fenolik gruplar açısından zengindir. 2328 cm⁻¹'deki absorpsiyonun (iskeletin polar olmayan parçaları na katkıda bulunur) 1050 cm⁻¹'deki (polar CO bağları na katkıda bulunur) absorpsiyona oranı olarak hesaplanan hidrofobiklik indeksi (HI), fulvik için 0,87'ye eşitti. sonuç olarak HPE için asitler ve 1,11. HPE'nin sorpsiyon kapasitesinin biyojenik metallere göre değişimi aşağıdaki sırayla gözlemlendi (mmol-eşd./g): Cu (7,6) > Zn (5,6) > Ca (4,3) > Fe (3,1). Kompleksleşmeye sadece karboksilik ve fenolik grupları değil, kinoid ve amid grupları da katkıda bulunabilir. Laktat dehidrojenaz ile katalize edilen enerji metabolizması ve gelişmesi, malonik dialdehit seviyesinin doza bağlı azalması (%30-70) ile karakterize olan lipoperoksidasyonun azalması ve SOD aktivitesinin artması in vitro sıçan kanı ile tahmin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hümik asit, fulvik asit, antioksidan, laktat dehidrojenaz, geçiş metalinin şelasyonu.

GİRİŞ

Hümik asitler, kimyasal veya biyolojik süreçlerle bozulan toprak, turba, doğal su, kömür, mumya ve diğer bitki, mikrop ve hayvan ürünlerinin bileşenleri olan doğal olarak oluşan bileşiklerin sınıfıdır. Hümik asitler, karboksilik, aromatik, fenolik hidroksil, keton ve kinoid yapı gibi farklı fonksiyonel grupları içeren makromoleküllerdir.1 Kimyasal yapısı, çözünürlüğü, moleküler ağırlığı, nitrojen içeriği ve C:O oranı.

HA ve FA tipik prospektif bileşikler olarak kullanılırlar. HPE'nin cilt yanıkları na tedavisinde antimikrobiyal, antiinflamatuar, antitümör, antiülser, onarıcı, hassaslaştırıcı özellikleri ve yüksek etkinliği in vitro, in vivo ve klinik uygulamalarda yapılan araştırmalarla kanıtlanmıştır.2-3

FA ile etkili bir şekilde tedavi edilen hastalık yelpazesi sürekli genişlemektedir. HPE harici olarak hematoma, flebit, desmoresis, miyogeloz, artroz, poliartrit, osteoartrit ve osteokondrozu tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca FA, gastrit, ishal, mide ülseri, dizanteri, kolit ve diyabet tedavisinde ağrıdan alınmıştır.2 Mumyanın bir parçası olan hümik asitler fareler üzerinde yapılan deneyde gerontolojik hastalıkları na tedavisinde etkinliğini göstermiştir.3

Bahsedilen hastalıkları na çoğuna yol açabilen biyokimyasal koşullar, aktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimi ve serbest radikallerin (LPO) üretiminin artmasıdır. ROS'un aşırı üretimini belirleyen ana nedenler şunlardır: 1) mitokondride oksidatif fosforilasyon süreçlerinden elektrolitlerin sıçması na yol açan sitokrom oksidaz aktivitesinin eksikliği; 2) süperoksit dismutazının (SOD) dengesiz aktivitesi 3) demir homeostazındaki değişiklikler. Son faktör, Parkinson hastalığı na gelişiminde en önemli olanıdır ve tedavinin unsuru Fe³⁺ şelatlamasıdır.4-6 FA ve HA'da

katekol ve fenolik hidroksiller gibi reaktif grupları na varlığı, insan eritrositlerini ROS'un etkisi altında hemolizden etkili bir şekilde koruyan gallik asitlerin, tanenlerin ve ellagik asitlerin esterlerine benzer antioksidan özelliklerini belirler.7 Koruyucu etkisi yukarıda belirtilen bileşikler ayrıca eritrositlerdeki laktat dehidrojenaz (LDH) seviyesinin düzenlenmesinde de gösterilmiştir.8 LDH indeksinin yüksek seviyesi nekroz dokusunda özellikle akut kalp yetmezliği ve böbrek, iskelet kasları, karaciğer, akciğerler ve cilt.

Bu yazıda turbadan su-etanol ekstraksiyonu yoluyla türetilen hümik asitlerin fiziko-kimyasal özelliklerini inceledik ve biyolojik aktivitelerini fare eritrositlerinde in vitro olarak tahmin ettik. Bu amaçla şunları inceledik: 1) FA ve HA'nın IR- ve UV-vis spektrumları; 2) asit grupları na içeriği; 3) suda çözünen kıyası m



FA olarak hümik asit fraksiyonu; 4) geçiş metali iyonları nı n sorpsiyonu – Fe(III), Zn, Cu; 5) hümik asidin antioksidan özellikleri ve bunları n tera eritrositlerindeki enerji metabolizması üzerindeki etkisi.

MALZEMELER VE YÖNTEMLER

Fulvik asitler ve fulvik ve hümik asitlerin karışı mı (Nizhny Novgorod turbası , Beauty Land Company, Rusya), sodyum hidroksit, sodyum karbonat, hidroklorik asit, **ethanol, purified water (resistivity $\geq 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{Cm}$).**

Toplam nitrojen, Kjeldahl yöntemiyle (VELP Scientifica) test edildi. Sulu çözeltilerin absorpsiyon spektrumları "Bio line Specord S-100" (Analytik Jena) ile kaydedilmiştir. IR spektrumları «IR Prestige-21» üzerine kaydedilmiştir.

(Shimadzu, Japonya) 4000-500 cm^{-1} aralı ğı nda (tabl.

KBr).Potansiyometrik titrasyon, "pH-150M" (Gomel, Beyaz Rusya) pH-metrelerinde sağlandı . Fe, Zn, Cu ve Ca içeriği, atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS Shimadzu AA 7000, Japonya) ile belirlendi.

HPE'nin Doğrudan Potansiyometrik titrasyonu

100 ml FA solüsyonları ve FA ve HA karışı mı (10 mg/%) 0,1 M NaOH ve 0,1 M Na_2CO_3 ile titre edildi.

Her titrant (0.2 ml) ilavesinden sonra denge sağlanana kadar sistem karışı mı ldı . Karboksil (pH 7.0) ve hidroksil (pH 10-11) grupları nı n titrasyonu sonundaki pH değerlerinden eşdeğer noktalar belirlendi.

HPE'nin geri potansiyometrik titrasyonu

0,1M NaOH solüsyonu HPE solüsyonuna pH 12 değerlerine kadar ilave edildi. Titrant 0,1M HCl idi. Sistem, kararlı pH değeri elde edilene kadar karışı mı ldı .

Asetat yöntemi ile asit grupları nı n belirlenmesi

HPE (0.01 g), 2 ml etanol ile işlendi; 10 ml 0,1 M sodyum asetat çözeltisi ve 40 ml su eklendi. Reaksiyon karışı mları 100 C'de karışı mı ldı .

40 dakika boyunca bir geri akı ş kondansatörü olan bir şişe içinde. Çökelti süzöldü ve 100 ml su ile iyice yı kandı ve sabitlenen serbest asetik asit, fenoltalein varlı ğı nda 0,05M KOH ile titre edildi. Asit grupları nı n cs içeriği denklem ile hesaplandı

$$m_{\text{as}} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot c}{V_1} \cdot m \quad (\text{mmol-eşd/g}),$$

burada V(KOH) – numunenin titrasyonu için kullanılan KOH hacmi, ml; c(KOH) – KOH konsantrasyonu, M; m – katı ağı rlı ğı , g; V1 – toplam hacim, ml; V2 – alikotun hacmi, ml.

Fe, Zn, Cu, Ca üzerindeki referans tuz çözeltisi ve dalga boyundaki delik katot lambaları ile atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS Shimadzu AA 7000, Japonya) kullanı larak Fe, Zn, Cu, Ca içeriğine ilişkin elementel analizler sağlandı . λ , nm:248,3; 213,9; 324,8; 422,7, buna göre. Asetilen-hava alevi kullanı ldı

2,2 L min- oranı ile tüm elementleri analiz edin ¹.

HPE'nin emme kapasitesinin temel analizi

$\text{Ca}(\text{OAc})_2$ sulu solüsyonunun fazlası , karışı mı larak süspansiyona (HA + FA) ilave edildi. Reaksiyon karışı mı 24 saat tutuldu ve daha sonra çökelti süzöldü, su ile yı kandı ve kurutuldu. Kalsiyum konsantrasyonu AAS yöntemi ile belirlendi.

Biyomedikal araştırma

Deney, "Stolbovaya" yetiştirme istasyonundan alınan Wistar sı çanları nı n kanı yla in vitro yapı ldı . Federal Devlet Bilim Kurumu «Bilim Merkezi

Federal Tı bbi ve Biyolojik Ajansı n Biyomedikal Teknolojileri» (Rusya Federasyonu, Moskova). Tüm hayvanlar, ET/S 129, 1986 kuralları na ve 86/609 ESC direktiflerine göre, yiyecek ve suya serbest erişimi olan standart koşullar altı nda tutuldu.

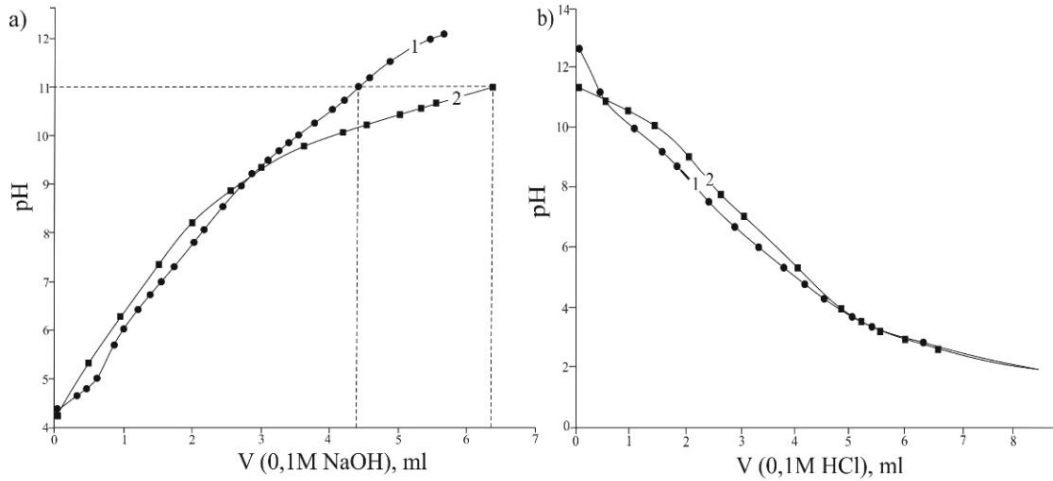
2 L, 5 L, 10 L sulu HPE solüsyonları (10 mg/%) sodyum sitrat ile stabilize edilmiş tam kana (1 ml) eklendi. Eritrositler iki kez %0.9'luk NaCl solüsyonu ile yı kandı ve ardı ndan 1600 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Plazma ve eritrositlerde lipid peroksidasyonunun bir belirteci olarak malonik dialdehit seviyesi M.Ukiyama, M.Mihara yöntemlerine göre ölçöldü. Yı kanmı ş kı rımı zı kan hücrelerinin (1:10) hemolizati ndaki SOD aktivitesi (SOD, EC 1.15.1.1), adrenalinin oto oksidasyon ürününün inhibisyonu ile belirlendi.9 Laktat dehidrogenaz aktivitesi (LDH, EC 1.1.1.27) yı kanmı ş kı rımı zı kan hücrelerinin hemolizati nda belirlenir (1:40). Doğrudan reaksiyonlarda (LDGdir) LDH'nin katalitik aktivitesi, bir substrat olarak 50 mM sodyum laktat kullanı larak tahmin edildi; ancak dolaylı reaksiyon (LDGind) – 23 mM sodyum piruvat kullanı larak.10 Enzimlerin spesifik aktivitesinin hesaplanması , modifiye Lowry yöntemine göre yapı lmı ştı r.11

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Fiziko kimyasal özellikleri

Doğrudan ve ters potansiyometrik titrasyondan elde edilen verilere göre hesaplanan hümik asit cs asit grupları nı n konsantrasyonu 4,4-4,5 mmol-eşd. sı rası yla numuneler (HA + FA) ve FA.12,13 c değerinin pH 7'deki karboksil grupları nı n konsantrasyonunu belirlediği ve cs değerlerinin pH 10-11'de fenolik ve karboksil grupları nı n toplamı na ⁵ karşı lı k geldiği varsayı lmı ştı r (Şekil 1).





Şekil 1: HPE'nin doğrudan (a) ve geri (b) Potansiyometrik titrasyon eğrileri: 1 – (HA+FA); 2 – FA.

Asetat yöntemiyle FA titrasyonunun sonuçları, numunelerin Potansiyometrik titrasyonuna kıyasla hafife alınır (Tablo 1).

(HA +) asit grupları nın konsantrasyonu C_s (FA) kullanılarak atomik absorpsiyon spektroskopisi ile belirlenir

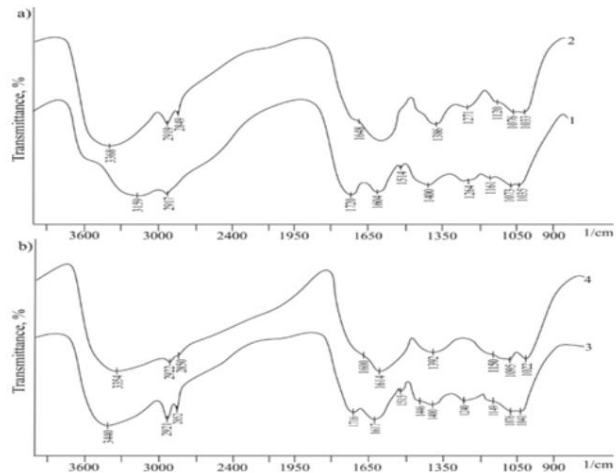
Hümk asitlerin kalsiyum asetat ile reaksiyon ürünleri olarak kalsiyum tuz kompleksleri, Potansiyometrik titrasyonla (4,3 mmol-eşd./g) tahmin edilen C_s 'ye yakındır. Bu sonuçlar, hümk asitlerin zayıf polielektrolit olarak potansiyometrik titrasyonunun geçerli yöntem olduğunu doğrulamaktadır.

Tablo 1: HPE'deki asit grupları nın tahlili.

Örnek	Yöntemler		C_s , asit konsantrasyonu gruplar, mmol-eq/g
	reaktif	Tahlil	
ANCAK	0.1M NaOH	doğrudan potansiyometri	6,4±0,03
	0.1M NaOH 0,1M HCl	geri potansiyometri	6,1±0,02
	0,1M CH ₃ COONa 0,05M KOH	Asetat yöntemi, geri titrasyon	4,6±0,05
HA+FA	0.1M NaOH	doğrudan potansiyometri	4,5±0,05
	0.1M NaOH 0,1M HCl	geri potansiyometri	4,4±0,07
	0,1M CH ₃ COONa 0,05M KOH	Asetat yöntemi, geri titrasyon	3,8±0,04
	Ca(OAc) ₂	AAS	4,3±0,01

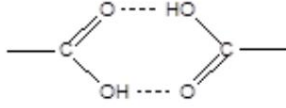
HPE'nin asit grupları nın toplam konsantrasyonu, emme kapasitesine veya emme kapasitesine karşı gelen iyon değişimi ve kimyasal soğurma özelliklerini yansıtır. 12,13Biyojenik geçiş metali iyonları kullanılarak HA + FA'nın emme kapasitesi şu şekildedir: çözünebilir tuzları (mmol eq/g) değiştirildi: Fe³⁺ (3,1) < Zn²⁺ (5,6) < Cu²⁺ (7,6). HA+FA'nın geçiş metalleri iyonları tarafından yüksek şelatlama kabiliyeti, sadece karboksil, fenolik, katekol grupları nın değil, aynı zamanda keto-, amido- ve kinoid yapıları nın varlığı ile açıklanabilir.

IR spektrumları nın verileri, HPE'nin işlevsel grupları nın kimyasal doğası hakkındaki bilgileri doğrular ve tamamlar (Şekil 2, Tablo 2). IR spektrumları, turbanın farklı fulvik asit örneklerinin IR spektrumları nın literatür verileri kullanılarak analiz edilmiştir (Tablo 2).14-18



Şekil 2: IR spektrumları : 1 – fulvik asit; 2 – Na-FA; 3-HPE; 4 – ferrihumat.

Hümk asitlerin heterojen yapı sı nı n bileşiminde içerebileceği ana fonksiyonel gruplar Tablo 2'de sunulmaktadır.



Ayrı şmamı ş karboksilik grupları n varlığı , 1720-'deki (C=O)st grupları nı n uzantı ları yla doğrulanı r.

1680 cm⁻¹ aralı ğı nda, (CO)st bağları nı n gerilmeleri 1315 ile 1200 cm⁻¹ arası ndadı r. 1400-1200 aralı ğı ndaki -1cm⁻¹ absorpsiyon bantları , OH bağları nı n düzlemsel deformasyonu ile CO dimerlerinin gerilmeleri arası ndaki etkileşimden kaynaklanmaktadır . Dimerler, OH bağları nı n uzantı ları nı n 3500-3000 cm⁻¹ aralı ğı nda daha geniş bir absorpsiyon bandı na sahiptir (Şekil 2, Tablo 2, makalede atı fta bulunulan SRFA numuneleri, PPFA ve FA numunesi ile ilgili veriler).8

Tablo 2: Hümk asitlerin IR spektrumları nı n verileri.

Örnekler	Dalga numarası , cm-1						
	OHst, NHst, alkoller, fenoller, asitler, aminler	CH3, CH2st, CHst, alkil grupları	C=Ost, ketonlar, asitler, kinonlar, C=Ost (amid I)	C=Cst, C=Ost, amid II, aromatik döngüler (COO-)st, olarak	C-OHst, C-OHst, (COO-)st, s, asitler, fenoller	Maliyet, alkoller, fenoller, esterler	—
SRFA[8] (IHSS)	-	2942 hafta	1722, 1623 omuz	-	1393, 1206	-	1,10
PPFA[8] (IHSS)	-	2942 hafta	1722 caddesi, 1623 omuz	-	1400, 1233	-	1,13
SAFA[8] (Shanghai Aladdin Reaktif Şirketi)	3393 cadde, brd	2850 hafta	1593	-	1398	1041	0,87
FA[16]	3600-3100 hafta, ortalama	2850 hafta	1670-1635 hafta 1550-1540 hafta	-	1410 sokak	1130-1110	-
(Güzellik Arazi Şirketi, Nijniy Novgorod)	3300-3100 cadde, brd	2920 hafta, 2850 hafta	1720 sokak	1604 sok, 1514 hafta	1400, 1264	1073, 1035	0,89
FA[18]	3400	2920	1720, 1650	1540	1400, 1200	1050	-
FA+HA	3416 sokak	2921 hafta, 2850 hafta	1714, 1623	1516	1327, 1267	1076, 1041	1,11
Ca-(FA+HA)	3388-3380 sokağı	2922 hafta, 2850 hafta	-	1600-1560	1411	-	-
Fe-(FA+HA)	3364-3342 caddesi	2922 hafta, 2852 hafta	-	1622	1392	1096, 1038	-
Cu-(FA+HA)	3381-3203 caddesi	2929 hafta, 2884	-	1600, 1573	1392	1111, 1061	-
Zn-(FA+HA)	3500-3300	2922, 2850	-	1616, 1514	1400	1141, 1065	-

İyonize form, CO grupları nı n 1650 ile 1540 cm⁻¹ arası nda güçlü bir bant şeklinde asimetrik gerilmesi ile karakterize edilirken, 1450 ile 1380 cm⁻¹ arası nda daha az yoğun bir bant simetrik gerilmelere aittir (Tablo 2, SAFA verileri) makalede atı fta bulunulan örnekler ve FA örnekleri).8,16

Alkoller ve fenoller, 3600 ila 2400 cm⁻¹ aralı ğı nda OH grupları nı n uzantı ları nı n güçlü absorpsiyon bantları nı ve 1410 ila 1260 cm⁻¹ aralı ğı nda OH grubunun deformasyonunu gösterir . CO bağları nı n yoğun gerilme bantları 1230-1000 cm⁻¹ aralı ğı ndadı r: birincil alkoller (1080-1000 cm⁻¹), ikincil alkoller (1150-1030) ve fenoller (1230-1140 cm⁻¹). SAFA, FA ve FA örnekleri üzerindeki çalışmalarla göre turbadan elde edilen fulvik asitler alkolce zengindir ve

fenolik gruplar.8,18 Asidik grupları n Potansiyometrik yöntemle analizi ve IR spektrum verileri dikkate alı ndı ğı nda fulvik asitler, fenolik asitlerin yeterli katkı sağladı ğı homojen olmayan makromoleküller olarak kabul edilebilir.

Hümk asit makromoleküllerinin hidrofobik alifatik fragmanları , CH3 ve CH2 -nin simetrik ve as) ile ilgili 2960 ve 2850 cm⁻¹ arası ndaki absorpsiyon bantları ndan tahmin edilebilir . antisymmetric stretches (25 and 2) gruplar.

2928 cm⁻¹'deki absorpsiyonun 1050 cm⁻¹ bölgesindeki absorpsiyona oranı olarak hesaplanan fulvik asitlerdeki hidrofobiklik indeksi (HI), apolar fragmanları n polar gruplara oranı nı yansı tı mı ştı r ve genellikle birbirine yakı ndı r.

1'e (Tablo 2). İncelenen FA örneklerinin HI değeri 0,89'a eşitti, karbon ve nitrojen içeriği sırasıyla %49,6 ve %2,1 idi.

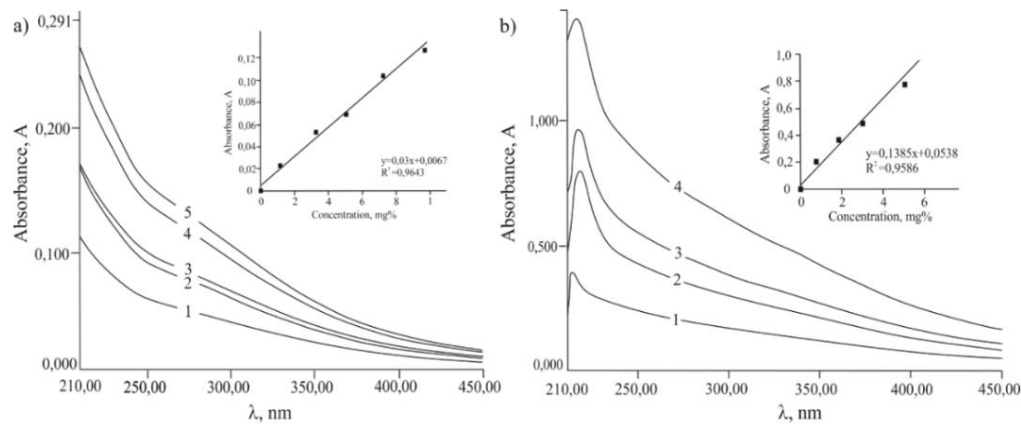
HA ve FA karışımının IR spektrumu, Stevenson tarafından turbadan izole edilen III FA tipi hümkik asitlerin spektrumuna yakındır. 18 Hümkik asitler ile kalsiyum, demir, çinko, ve bakır tuzları 1600-1630 cm⁻¹ aralığında karboksilat iyonlarını uzantılarını özgü yoğun bantlara sahiptir, ancak 1254 cm⁻¹'deki bant yoktur (Tablo 2). Muhtemelen, kompleksleşme büyük ölçüde reaktif COOH gruplarından kaynaklanmaktadır ve bir tuz karakterine sahiptir.

HPE'nin Zn²⁺ ve Cu²⁺ iyonları ile ilgili olarak asit gruplarını (COOH ve Ph-OH) konsantrasyonundan neredeyse 1,5 kat daha yüksek olan yüksek sorpsiyon kapasitesi, kinit, amid ve diğer grupların kompleksleşmeye katıldığını gösterir. Fülvik asit içeriğinin yaklaşık bir tahmini

HPE numuneleri, suda ve 0,1 M NaOH çözeltisinde 280 nm'de çözeltilerin (HA + FA) UV spektrumları ile analiz edildi (Şekil 3). Sistemin yalnızca iki tür makromolekül tarafından temsil edildiği ve hangi konsantrasyonun Lambert-Bouguer Ber yasasını takip ettiği varsayılabılır. HA ve FA'nın 0,1 M NaOH'de oldukça çözünür olduğu ve buna bağlı olarak ANaOH'nin absorpsiyonunun toplam HA ve FA konsantrasyonunu yansıttığı ve sadece fulvik asidin suda çözündüğü gerçeği dikkate alındığında, nispi oran humik asit d₂₈₀ can be expressed as:

$$= \frac{A_{280}}{c \cdot l}$$

A, burada ANaOH ve H₂O₂ - humik emilimi ve fulvic acids in 0,1M NaOH solution at $\lambda=280$ nm.



Şekil 3: Karışımın (HA+FA) su (a) ve 0 konsantrasyonundaki (HA+FA) UV-vis 0,1MNaOH solution (b) at $\lambda=280$ nm. The spektrumları, mg/%: a)1,6; 3,8; 5,3; 7,5; sırasıyla 9,8; b) 0,98; 2; 3,1; sırasıyla 5,2. Ekler, $-280=f(c,mg\%)$ kalibrasyon eğrileri ile temsil edilir.

Numunede %100- olarak hesaplanan fulvik asit içeriği % 35±5'e karşılık geldi. Genel olarak, HPE gibi fenolik asit fragmanları içeren incelenen fulvik asitlerin sadece ROS'u inaktive etmekte kalmayıp aynı zamanda ayrıca demir iyonlarını ve diğer metallerin şelatlaşması nedeniyle antioksidan aktivite sergilemek.

Ayrıca, FA için hidrofobiklik indeksi HI ve sırasıyla 0,87 ve 1,11'e eşit (HA + FA) dikkate alındığında, fulvik asitlerin sudaki çözünürlüğü,

HPE ve FA, biyolojik aktivite için optimal lipofilikliğe sahip makromoleküller olarak kabul edilebilir.

Hümkik asitlerin biyolojik özellikleri

Hümkik asitlerin ve bunların sodyum tuzlarını (Na FA ve Na-(HA+FA)) kan plazmasındaki ROS süreçlerinde enzim olmayan antioksidan aktivite üzerindeki etkisi benzersiz değildir ve önemsizdir (Tablo 3). Kan plazmasındaki malonik dialdehit (MDA) seviyesi %2-12 oranında azaldı.

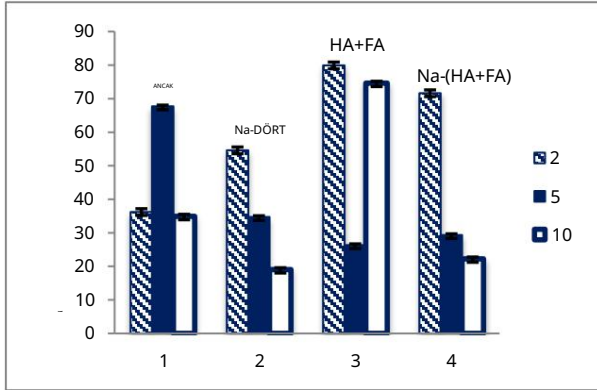
Tablo 3: Hümkik asitlerin etkisi altında LPO'nun karakterizasyonu

№	Hümkik asitlerin koloidal sistemleri	MDA*(plazma)		MDA(eritrositler)					
		2µg		2µg		5µg		10 mikrogram	
		kontrol yüzdesi	sn ²	kontrol yüzdesi	sn ²	kontrol yüzdesi	sn ²	kontrol yüzdesi	sn ²
1	ANCAK	97,8	0,01	36,2	3,48	67,7	0,04	34,9	0,01
2	Na-DÖRT	86,7	0,02	54,6	0,02	34,7	0,02	19	0,04
3	HA+FA	87,1	0,01	79,9	0,05	26,3	0,02	74,6	0,02
4	Na-(HA+FA)	110,7	0,01	71,6	0,01	29,3	0,02	22,2	0,02
5	Kontrol	100,0	0,02	100,0	0,20	100,0	0,02	100,0	0,25

MDA* - LPO'nun ana ürünü olarak malonikdialdehit



HPE'nin ROS'un enzimatik olmayan sürecindeki güçlü etkisi ve eritrositlerde ROS'un bir ürünü olarak MDA'daki doza bağlı etkisi kaydedilmiştir (Şekil 4).

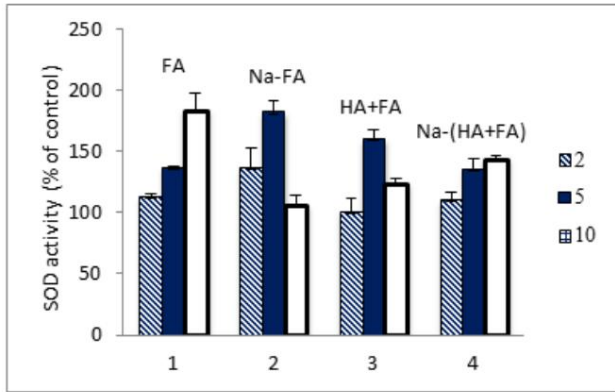


Şekil 4: Hüyük asitlerin ve tuzları nı n in vitro LPO (kontrol yüzdesi) üzerindeki doza bağı mlı etkisi .

Tablo 4: Hüyük asitlerin ve bunları n tuzları nı n etkisi altı ndaki SOD aktivitesi (% kontrol).

Doz, µg/ml	ANCAK		Na-DÖRT		HA+FA		Na-(HA+FA)	
	%	² sn	%	² sn	%	² sn	%	² sn
2	112,4	3,28	136,0	16,97	100,5	10,71	109,6	6,81
5	136,1	1,68	181,6	9,58	159,7	7,75	134,9	8,69
10	182,7	15,06	105,9	8,33	123,1	4,49	142,8	3,49

Fülvik asitlerin ve tuzları nı n (FA ve Na FA) tüm dozlarda SOD aktivitesi üzerindeki etkisi, Na-FA'nı n iyonize formu hariç, fülvik ve hüyük asitlerin (HA + FA) karı şı mları ndan daha önemliydi. büyük doz (1 ml'de 10 µg).



Şekil 5: Hüyük asitlerin ve tuzları nı n in vitro SOD'nin (kontrolden %) enzim aktivitesi üzerindeki doza bağı mlı etkisi.

Muhtemelen eritrositlerin antioksidan rezervlerinin artması , hem MDA seviyesindeki azalma hem de SOD aktivitesindeki artı şı ile kanı tlandı ğı gibi LPO zincir reaksiyonları nı n parçalanması na katkı da bulunmuştur. Aynı zamanda, antioksidan savunma sisteminin enzimatik ve enzimatik olmayan bağı mlı ları nı n lipoperoksidasyon süreçleri üzerindeki baskı nlı ğı , hüyük asitlerin etkisi altı nda biyolojik oksidasyon sisteminin inhibisyonunu gösterebilir.

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi, hücrelerin enerji metabolizması nda anahtar rol oynadı ve oranı

İyonize fülvik asitler ve hüyük asitler Na-FA ve Na-(HA + FA) ile karı şı mları , iyonize olmayan formlara kı yasla 1 ml'de 5-10 µg'de daha iyi etki gösterir. FA'nı n iyonize olmayan formları ve (HA + FA), eritrositlere etki eden konsantrasyona karşı daha az duyarlı dı r. MDA seviyesi, iyonize ve iyonize olmayan hüyük asitlerin etkisiyle %30'dan %60'a önemli ölçüde düşürülmüştür (Tablo 3).

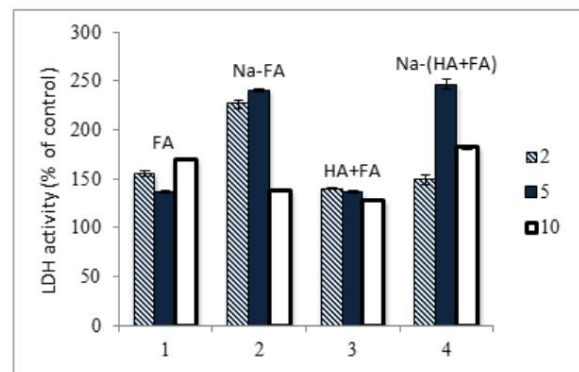
MDA açı sı ndan eritrositlerdeki lipo peroksidasyon yoğunluğunun azaltı lması , en çok fülvik asitlerin ve bunları n tuzları nı n kullanı lması durumunda etkili olmuştur.

Eritrositlerdeki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin artı şı , tüm hüyük asitlerin 1 ml'si başı na 5 µg eklendiğinde kaydedildi (Tablo 4, Şekil 5).

hücrelerde laktat/piruvat ve NAD/NADH+ buna bağı lı ydı . Doğrudan reaksiyonda, aerobik koşullar altı nda Krebs döngüsünde kullanı labilen laktattan piruvat oluşur. LDH'nin dolaylı reaksiyonu,

piruvattan laktat oluşumu ve hücrede anaerobik sürecin ifade derecesini karakterize eder.

2, 5 ve 10 µg (Şekil 6, Tablo 5) tüm dozlarda doğrudan reaksiyonda tüm hüyük asitler ve bunları n tuzları eklendiğinde, LDH aktivitesi kontrole göre %26-55 oranı nda arttı şı r (Şekil 6, Tablo 5).



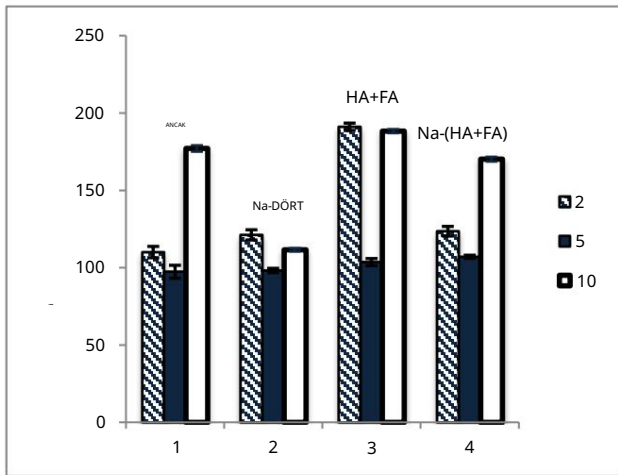
Şekil 6: Hüyük asitlerin ve tuzları nı n in vitro doğrudan reaksiyonda (kontrolden %) LDH aktivitesi üzerindeki doza bağı mlı etkisi .

Hüyük asitlerin Na-tuzları nı n ml başı na 2 ve 5 µg dozunda karşı lı k gelen iyonize olmayan formlardan daha etkili oldu ğuna dikkat edilmelidir.

Tablo 5: LDH'nin doğrudan ve dolaylı reaksiyondaki aktivitesi.

Doz µg/ml	ANCAK		Na-DÖRT		HA+FA		Na-(HA+FA)	
	LDHd	LDHind	LDHd	LDHind	LDHd	LDHind	LDHd	LDHind
2	155,2±3,17	110,1±3,71	226,6±4,20	121,2±3,31	139,7±0,66	191,1±2,37	148,9±5,2	123,6±3,10
5	136,8±1,00	97,4±4,17	240,5±1,29	98,2±1,38	136,3±1,13	103,6±2,35	246,6±4,69	107,1±0,97
10	169,4±1,38	177,1±2,06	137,9±1,25	111,6±1,05	127,4±0,42	188,3±1,23	181,9±1,38	170,2±1,50

2 ve 10 µg/ml dozları nda LDH aktivitesi kontrole kı yasl a %10'dan %60'a yükselirken, 5 µg/ml'de LDHd aktivitesinde değişiklik olmadı (Şekil 7, Tablo 5).



Şekil 7: Hümk asitlerin ve tuzları nı n in vitro indirekt reaksiyonda (kontrolden %) LDH aktivitesi üzerindeki doza bağı mlı etkisi .

Direkt reaksiyonda LDH aktivitesinin dolaylı reaksiyona göre artması , ağı rlı klı olarak H-LDH formunun (LDHd) oluşturduğu pirüvik asit içeriğinde artı şa neden olabilir. Aerobik koşullar altı nda piruvat, çeşitli dokulardaki biyokimyasal reaksiyonlarda hı zla kullanı lı r. Piruvik asidin önemli rolü, piruvatı n mitokondride asetil-koenzim A'ya dönüştürülmesinde ve daha sonra metabolize edilmesindedir.

Ana evrensel enerji kaynağı olan adenosin trifosfatı oluşturmak için Krebs döngüsünü oksidatif fosforilasyon takip eder.

ÇÖZÜM

Böylece hümk asitler, hücrelerin enerji metabolizması nı arttı rı r ve enzimatik aktivitenin (SOD) artması ve serbest radikal oksidasyon yoğunluğunun azalması na yol açan enzimatik olmayan antioksidan koruma ile ortaya çı kan antioksidan özelliklere sahiptir. Hümk asitlerin lipit peroksidasyon sistemi ve laktatehidrojenaz aktivitesi üzerindeki etkisinin doza bağı mlı etkileri ortaya çı ktı . Fülvik asitlerin hem enerji metabolizması hem de SOD aktivitesi üzerindeki etkisi, HA + FA karı şı mları ndan daha güçlüdür.

Hümk asitlerin iyonize formları nı n enerji metabolizması üzerinde iyonize olmayan formları ndan daha büyük bir etkiye sahip olması çok önemlidir. Bu sonuçları n açı klaması hümk asitlerin sodyum tuzları nı n kı rrmı zı kan hücrelerinin "gölgelerini" doldurarak metabolizmaya (oksidatif ve enerjik) katkı lma olası lı ğı dı r.19

REFERANSLAR

1. Stevenson FJ, Humus kimyası . Genesis, kompozisyon, reaksiyonlar, Wiley Inter science, 1982, 221-237.
2. Rodríguez NC, Urrutia EC, Gertrudis BH, Chaverri JP ve Mejia GB, Fulvik asidin antioksidan aktivitesi: Canlı maddeden türetilmiş bir biyoaktif bileşik, Journal of Food, Agriculture & Environment, 9, 2011, 123-127.
3. Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Ah SY, Woo SB, Jeong C.- S., Klubachuk ON ve Kwon BS, Mumie'den Hümk Maddelerin Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri, Tarı m ve Gı da Kimyası Dergisi, 51, 2003, 5245-5254.
4. Schaik JW, Persson I., Kleja DB, Gustafsson JP, Asit Sulu Çözeltilerde Demir ve Fulvik Asit Arası ndaki Reaksiyonlar Üzerine EXAFS Çalı şması , Çevre Bilimi ve Teknolojisi,42,2008, 2367-2373.
5. Cornejo A., Jim'enez JM, Caballero L., Melo F. ve Maccioni RB, Fulvic Acid Inhibits Aggregation and Promotes Disassembly of Tau Fibrils Associated with Alzheimer's Disease, Journal of Alzheimer's Disease, 27, 2011, 143-153.
6. Verma S., Singh A., Mishra A., Fulvik asidin Aβ17-42'nin toplanma öncesi ve sonrası durumu üzerindeki etkisi: Moleküler dinamik simülasyon çalı şmaları , Biochimica et Biophysica Acta, 1834, 2013, 24-33.
7. Priyadarsini KI, Khopde SM, Kumar SS ve Mohan H., Free Radical Studies of Ellagic Acid, a Natural Fenolic Antioxidant, Journal of Agricultural and Food Chemistry,50, 2002, 2200-2206.
8. Li M., Chen Y., Su Y., Wan R. ve Zheng X., Farklı özelliklere sahip fulvik asitlerin biyolojik denitrifikasyon üzerindeki etkisi, Royal Society of Chemistry, 6, 2016, 14993.
9. Sirota TV, Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi için adrenalin otooksidasyon uygulaması nı n araştırılması yarıncı yeni bir Biomeditsinskaya Khimiya, 45, No. 2, 1999, 263-272. (Rusça).
10. Solovyeva AG, Zimin Yu.V., Isı yaralanması olan hastaları n kan metabolizması dinamiklerinin yeni bir tahmin yöntemi Tı pta modern teknolojiler, 2 ve 2012. (Rusça).

11. Su kuyusu J. H., Matthews HR, Protein miktarı nı n belirlenmesi için Lowry yöntemi, *Methods Molecular Biology*, 32, №1, 1994, 1-4.
12. Khil'ko SL, Kovtun AI ve Rybachenko VI, Humik Asitin Potansiyometrik Titrasyonu, *Katı Yakıt Kimyası*, 45, No. 5, 2011, 337-348.
13. Andjelkovic T., Perovic J., Purenovic M., Blagojevic S., Nolic R., Andjelkovic D., Bojic A., A direct potentiometric titration study of the dissociation of humic acid with with Selectiveblocked Functiongroups, *Eletica Quimica*, 31, Sayı 3, 2006.
14. Savchenko IA, Korneeva IN, Plaksin GV, Luksha EA, Goncharov DS, Humik asitlerin standardizasyonuna yeni bir yaklaşı m, *Modern bilim ve eğitim sorunları*, No. 3, 2013 (Rusça).
15. Shigabayeva GN, Topraklarda ve çimlerde humik maddelerin elemental bileşimi ve fonksiyonel grupları nı n seviyesi farklı köken, Tyumen Eyalet Üniversitesi Bülteni, No. 12, 2014 (Rusain'de).
16. Li H., Li Y. ve Li C., Arıtma çamurundan türetilen humik asitlerin ve fulvik asitlerin karakterizasyonu, *Asian Journal of Chemistry*, 25, No. 18, 2013, 10087-10091.
17. Baglieri A., Vindrola D., Gennari M., Negre M., Farklı pH değerlerinde çözünmeyen ve çözünen humik asit fraksiyonları nı n kimyasal ve spektroskopik karakterizasyonu, *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2014.
18. Stevenson FJ, Goh KM, Humik asitlerin ve ilgili maddelerin kı zı l ötesi spektrumları, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 35, 1971, 471-483.
19. Metzler DE, *Biyokimya: canlı ları n kimyasal reaksiyonları hücreler*, Academic Press, 1980 (Rusça).

Destek Kaynağı : Yok, Çı kar Çatı şması : Yok.

