

## Alifatik Alanlarda Oksijen Alkil-İlgili Grupları n Bağlı l Bolluğu Hümik Asitlerin Ana Farmakolojik-Pleiotropik Etkilerinde Yer Alı r

Vaclav Vetvicka,<sup>1</sup> Aruna Vashishta,<sup>2</sup> Marta Fuentes,<sup>3</sup> Roberto Baigorri,<sup>3</sup>  
Jose M. Garcia-Mina,<sup>3,4</sup> ve Jean-Claude Yvin<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Patoloji Bölümü, Louisville Üniversitesi, Louisville, Kentucky, ABD.

<sup>2</sup>Nörolojik Cerrahi Bölümü, Kentucky Omurilik Yaralanması Merkezi, Louisville, Kentucky, ABD.

<sup>3</sup>Timac Agro International-Roullier Group, Ar-Ge Departmanı , Poligono Arazuri Orcoyen, Orcoyen, İspanya.

<sup>4</sup>Kimya ve Toprak Kimyası Bölümü, Navarra Üniversitesi, Madrid, İspanya.

<sup>5</sup>Ar-Ge Departmanı , Timac Agro International, Dinard, Fransa.

**ÖZET** Hümik asidin (HA) oldukça yaygın olarak bulunması na rağmen, biyolojik etkisine dair tam bilgimiz hala eksiktir. Bu makalede, önce birkaç HA'nı n fizikokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirdik ve ardından bunları n interlökin-2 sekresyonunu, antikor sekresyonunu, yara iyileşmesini (HaCaT hücrelerini kullanan bir in vitro model), kanser büyümesini (Lewis akciğer karsinomu) etkileme yeteneklerini değerlendirdik. (modeli) ve hepatotoksisteye karşı koruma. Test edilen tüm reaksiyonlarda, HA, kanser büyümesinin baskı lanması ve lipopolisakarit kaynaklı hepatotoksitenin inhibisyonu dahil olmak üzere immün reaksiyonlar üzerinde önemli uyarı m gösterdi. Bu etkiler kimyasal özelliklerine bağlı ydı . Bu makalede gözlemlenen HA'nı n pleiotropik etkileri, bu bileşiklerin insan beslenmesindeki olası rolünü düşündürmektedir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** antikorlar hepatotoksiste hümik asitler IL-2

### GİRİŞ

Hümik asit (HA), oldukça yaygın olarak bulunan bir organik bileşiktir. Yüksek moleküler ağı rlı kılı (MW) makromoleküller. Bu bileşikler linyit, çim, toprak ve içme suyunda bulunabilir.<sup>1</sup> Fulvik asitlerle birlikte, hümik maddeler olarak adlandırılı r ve bazı ları tarafı ndan inert, diğerleri tarafı ndan toksik olarak kabul edilen organik bileşikler grubunun belirli fraksiyonları nı temsil eder.<sup>2</sup>

HA'nı n savunma reaksiyonları üzerindeki etkileri uzun süredir bilinmektedir. Birinci Dünya Savaşı sı rası nda, enfeksiyonları önlemek için turba özleri kullanıldı .<sup>3</sup> Daha sonra antimikrobiyal,<sup>4</sup> antiinflamatuar,<sup>5</sup> ve antiviral<sup>6</sup> özellikleri bulundu. İlave çalı şmalar, lenfosit proliferasyonunun uyarı ldı ğı nı ,<sup>7</sup> sı vı sal bağış ıklı k tepkisinin uyarı ldı ğı nı <sup>8</sup> ve çiftlik hayvanları nı n sağlı ğı nı n iyileştirildiğini gösterdi.<sup>9</sup> Kendi çalı şmaları mız, bağış ıklı k tepkimesinin hem hücre sel hem de sı vı sal dalları nı n önemli ölçüde uyarı ldı ğı nı gösterdi.<sup>10</sup> Bununla birlikte, bazı araştı rımlar, HA'nı n olumsuz etkileri, yani oksidatif DNA hasarı <sup>12</sup> veya nükleer faktör- $\beta$  aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla yüksek doz HA11 tarafı ndan indüklenen bağış ırsak hücrelerinde kromozomal anormallikler.<sup>13</sup>

Daha önceki gözlemlerimize dayanarak, farklı ana fonksiyonel grup dağı lı mına, belirgin MW'ye ve biyolojik ortamda potansiyel kimyasal oksidatif reaksiyonlara sahip hümik maddelerin seçimine dayanan yeni bir HA numunesi versiyonu hazı rlandı k. Bu özellikler, temel analiz, 13C nükleer manyetik rezonans (NMR), kız ı lötesi spektroskopisi Fourier dönüşümü kız ı lötesi spektroskopyası (FTIR), yüksek performanslı boyut dı şlama kromatografisi (HPSEC) ve elektronik döndürme rezonansı (ESR) kullanı larak incelenmiştir. Temel amacı mız, alifatik ve aromatik alanlarda ve çeşitli görünür MW'de, başta fenol grupları olmak üzere fonksiyonel gruplar içeren oksijenin farklı nispi konsantrasyonları ile HA'nı n farmakolojik aktivitesini tanımlamaktır. Bunun nedeni, fenol ve fenol aracı lı dönüşümlerin hümik maddelerin farmakolojik aktivitesine doğrudan dahil olabileceğini gösteren önceki bir çalı şmaydı .<sup>10</sup>

### MALZEMELER VE YÖNTEMLER

#### Hayvanlar

Dişi, 6 ila 10 haftalık BALB/c fareleri, Jackson Laboratuvarı 'ndan (Bar Harbor, ME, ABD) satın alındı . Tüm hayvan çalı şmaları , Louisville Üniversitesi IACUC protokolü #10012'ye göre yapı ldı .

El yazması 16 Ağustos 2012'de alındı . Revizyon 13 Mart 2013'te kabul edildi.

Adres yazı şmaları : Vaclav Vetvicka, PhD, Department of Pathology, University of Louisville, 511 S. Floyd, Louisville, KY 40202, ABD, E-posta: vaclav.vetvicka@louisville.edu

## Malzemeler

RPMI 1640 ortamı , sodyum sitrat, ovalbümin, antibiyotikler, Wright lekesi, Limulus lizat testi E-TOXATE, Freund adjuvanı , penisilin, streptomisin, HEPES, lipopolisakarit (LPS), polimiksin B ve Concanavalin A, Sigma Chemical Co.'dan temin edildi. (St. Louis, MO, ABD). Fetal dana serumu (FCS) Hyclone Laboratories'den (Logan, UT, ABD) alınmıştır.

## Hümkik asit

Farklı HA'lar, Uluslararası Hümkik Maddeler Derneği (<https://ihss.humicsubstances.org>) tarafından belirtilen metodoloji izlenerek çeşitli bitkisel organik malzemelerden ekstre edildi. Metinde HA'lar A, B, C, D ve E olarak adlandırılmıştır. Bu HA seçimleri, yukarıda açıklanan yapısal özelliklere göre 15 farklı HA'dan gerçekleştirilmiştir.

## Boyut dağılımı kromatografisi

Moleküler büyüklük dağılımı HPSEC ile değerlendirildi. Kromatografik sistem, bir Waters 600 Kontrolör pompası ve ardından seri olarak iki dedektörden oluşuyordu: 400 nm'ye ayarlanmış bir Waters 996 Fotodiyot Dizisi Detektörü ve bir Waters 2424 Kırıma İndeksi Detektörü. Boyut dağılımı ayrılmı , bir PL aquagel-OH 30 kolonu (Polymer Laboratories, Shropshire, Birleşik Krallık) ve ardından aynı durağan faza sahip bir koruma kolonu ile gerçekleştirildi. Bu sütun için genel MW ayırma aralığı 100–300.000 Da'dır.

Her numune için 0.05 M NaNO<sub>3</sub> içinde 800 ppm karbon çözülteleri hazırlandı. Tüm numunelerin enjeksiyon hacmi 100 µL, kullanılan yama sıvısı 0,05 M NaNO<sub>3</sub> (pH 7) ve akış hızı 1 mL/dak idi. Boşluk hacmi (V<sub>0</sub> = 6.65 mL) ve permeasyon hacmi (V<sub>p</sub> = 11.82 mL), sırasıyla MW 43.250 Da'lık polietilen oksit ve metanol ile belirlendi.

HS numuneleri için HPSEC kromatogramlarından yaklaşık bir MW dağılımını değerlendirmek için evrensel bir kalibrasyon gerçekleştirildi. Elüsyon hacmine karşı log J eğrileri, MW olarak bilinen polietilen glikol ve polietilen oksit standartları kullanılarak elde edildi. J parametresi içsel viskozite [g] ve MW'nin (J<sub>i</sub> = [g]IM<sub>i</sub>) ürünü olarak tanımlanır ve hidrodinamik hacimle orantılıdır. Bu, aynı hidrodinamik hacme sahip iki makromolekülün eşit J değerlerine sahip olacağı anlamına gelir.

Mark–Houwink–Sakurada denklemi [g]<sup>1/4</sup>yi MW ile şu şekilde ilişkilendirir:

$$[\eta] = K M^a$$

burada K ve a, her bir makromolekül, çözücü ve sıcaklık için uygun sabitlerdir. Bu çalışmada, toprak HA için K değerlerini ve Visser<sup>14</sup> tarafından hazırlanan bir raporu kullandık (K = 2,724 · 10<sup>-2</sup> mL/g ve a = 0,45).

## 13C NMR çalışmaları

13C NMR spektrumları , çapraz polarizasyon kullanılarak 75.429 MHz'de bir Varian Unity 300 spektrometre üzerinde elde edildi

5 kHz döndürme hızı , 90 darbe genişliği, 69 ms alma süresi ve 1.0 s gecikme ile sihirli açılı döndürme tekniği. Spektrumlar, Tablo 2'de belirtilen kimyasal kayma bölgelerine bölünmüştür. Farklı bir C tipine karşı gelen her bölge için, bu bölgenin piklerinin altındaki alan hesaplanmıştır ve spektrum altındaki toplam alanın %'si olarak verilmiştir.

## FTIR çalışmaları

Her dondurularak kurutulmuş numuneden 1 mg 100 mg KBr ile karıştırılarak karışım homojen hale getirilerek tabletler hazırlandı. Kızı lötesi spektrumlar, 4000–400 cm<sup>-1</sup> üzerinde bir Nicolet Magna-IR 550 spektrometre ile bu toplamlara kaydedildi.

1 aralık.

## ESR çalışmaları

Toz haline getirilmiş liyofilize numunelerin elektron paramanyetik rezonans spektrumları , bir Bruker ESP300E spektrometre kullanılarak aşağıdaki çalışma koşullarında kaydedildi: modülasyon frekansı , 100 kHz; çalışma frekansı , 9,78 GHz; frekans gücü, 1 mW; modülasyon genişliği, 3.199 G; tarama genişliği, 80 G; tarama süresi, 83.886 sn; merkez alan, 3483 G. Standart olarak 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil kullanıldı.

## Hücre hatları

İnsan ölümsüzleştirilmiş tümörjenik olmayan keratinosit hücre hattı HaCaT15 , %10 sıvıyla inaktive edilmiş FCS, 100 U/mL penisilin ve 100 ug/mL streptomisin ile takviye edilmiş HEPES tamponu içeren RPMI-1640 içinde, 37°C'de tek kullanımlık plastik doku kültürü şişelerinde muhafaza edildi. %5 CO<sub>2</sub> / %95 hava inkübatörü. Lewis akciğer karsinomu hücreleri, Dr. G. Ross'tan (Louisville Üniversitesi) elde edildi ve Kogan ve ark.<sup>16</sup>'da açıklanmış gibi yetiştirildi.

## Birleşik HaCaT hücre çizik yara testinin mekanik yaralanması

HaCaT hücreleri, 5 cm'lik bir Petri kabı üzerinde birleşen tek tabakalara büyütüldü. İn vitro yara tahlili, hücrelerin fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkanması ardından gerçekleştirildi. Test , açıklanmış gibi yapıldı. 17 Test edilen maddeler, 0,1–10 ug/mL konsantrasyon aralığında kullanıldı. Bir kontrol olarak, çizilmemiş hücreler, çizilmiş hücreler için tarif edildiği gibi aynı şekilde muamele edildi. Bir Nikon Ters mikroskop tutulması TE300'e bağlı TE-FM Epi-Floresan sistemi kullanılarak yaralanma birden fazla fotoğrafı çekildi ve hücresel iyileşme alanlarını yüzdesi MetaMorp 6.2 yazılımı (Universal Imaging, Molecular Devices, Synnyvale, CA, ABD) kullanılarak analiz edildi. ).

## İnterlökin-2 üretiminin değerlendirilmesi

Safleştirilmiş dalak hücreleri ( %5 FCS ile RPMI 1640 ortamında 2 · 10<sup>6</sup> /mL), 24 oyuklu bir doku kültürü plakasını oyuklarına ilave edildi. Pozitif kontrol oyuklarına 1 ug Con canavalin A ilave edildikten sonra hücreler inkübe edildi.

nemlendirilmiş bir inkübatörde 72 saat süreyle. Kübasyonun son noktası nda, süpernatantlar toplandı ve interlökin (IL)-2'nin varlığı açısı ndan test edildi. IL-2 seviyeleri, bir Quantikine fare IL-2 kiti (R&D Sys tems, Minneapolis, MN, ABD) kullanılarak ölçüldü.

#### antikor oluşumu

Farelere iki kez (2 hafta arayla) 100 ug ovalbumin enjekte edildi ve serum, son enjeksiyondan 7 gün sonra toplandı . Ovalbumine karşı spesifik antikorları n seviyesi, enzime bağlı immünosorbent deneyi ile tespit edildi. Pozitif kontrol olarak Freund adjuvanı kullanıldı .

#### Lewis akciğer karsinomu tedavisi

Farelere kas içinden 5 · 10<sup>6</sup> Lewis akciğer karsinomu hücreleri enjekte edildi. Siklofosamid (150 mg/kg), tümör uygulaması ndan sonraki 10. günde intraperitoneal (ip) olarak kullanıldı ve tümör uygulaması ndan sonra 0. günden 14. güne kadar oral olarak HA (100 ug/fare) kullanıldı .16 Farelere kontrol grubu, günlük olarak alınıldı . Her grup en az beş fare tuttu. Deneyin sonunda, farelere ötenazi uygulandı , akciğerler çıkarıldı , %10 formalinde sabitlendi ve akciğer dokusundaki hematojen metastazları n sayısı , 8 · büyütmede bir binoküler lens kullanılarak tahmin edildi.

#### apoptoz

Kontrol grubundan (PBS) altı fare ve HA grubundan altı fare servikal dislokasyon ile öldürüldü. Dalaklar, RPMI 1630 ortamı nda bir cam homojenleştirici içinde parçalandı ve süspansiyon yapıldı . Hücreler, 96 U-tabanlı mikrotitre plakası na (oyuk başı na 0.75 · 10<sup>6</sup>) pipetlendi ve ardından 2 · floresansla etkinleştirilen hücre ayırma (FACS)-PBS (PBS, %0.1 jelatin, %0.02 sodyum azid) içinde yıkandı . Monoklonal antikorları n spesifik olmayan bağlanması nı önlemek için yıkanan hücreler, buz üzerinde 20 dakika süreyle %10'ı sısı ile inaktive edilmiş fare serumu ile bloke edildi ve 1:2500 oranı nda seyreltilmiş mAb CD19-biyotin (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, FL, ABD) ile boyandı ( Kuyu başı na 10 L) buz üzerinde 30 dakika. 3° yıkandıktan sonra, 1:200 seyreltilmiş PE-Cy7-işaretli streptavidin (Cal etiketi, Burlingame, CA, ABD), buz üzerinde 30 dakika süreyle biyotinlenmiş CD19 antikoruna (oyuk başı na 10 uL) bağlanmak üzere ilave edildi. Streptavidin bağlanması ndan sonra, hücreler 2 · FACS-PBS ile yıkandı ve 1 · Annexin V bağlama tamponunda (AmCam, Cambridge, MA, ABD) yıkandı ve ardından floresan izotiyosiyanat etiketli Annexin V ile boyandı , 1 seyreltildi: Buz üzerinde 15 dakika boyunca 100 (kuyu başı na 10 uL). Son olarak, her oyuktaki hücreler, 20 uL Annexin V bağlama tamponunda yeniden süspansiyon edildi. Ölçümden on dakika önce, ölü hücreleri hariç tutmak ve apoptozun (nekroz ve nekroz) aşamaları nı boyamak için tüm örnekler 10 uL Hoechst 33258 boyası (Molecular Probes, Grand Island, NY, ABD), son dilüsyon 0,1 ug/mL eklendi. geç faz). FACS analizleri, LSRII Enstrümanı nda (Becton-Dickinson) yapıldı . Toplanan veriler, sitometrik veri analiz yazılımı FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, ABD) ile analiz edildi.

#### hepatotoksiste

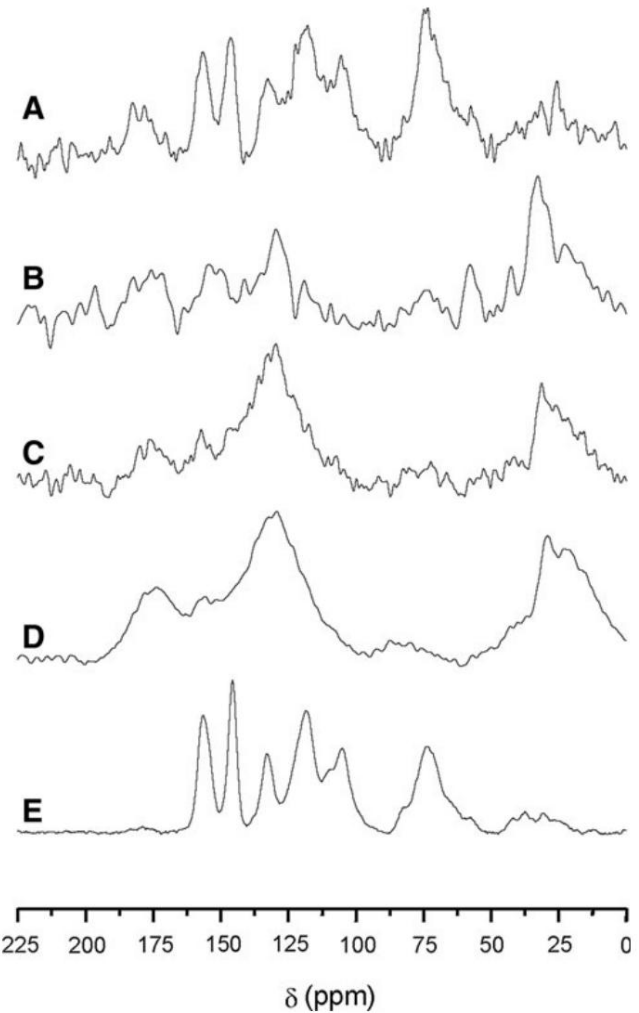
Deneyel olarak indüklenen hepatotoksiste, Neyrinck ve ark.18'e göre yapıldı . On beş fare, 2 hafta boyunca PBS (kontrol) veya HA (100 ug/fare) ile beslendi, ardından bir ip LPS enjeksiyonu (10 mg/kg) yapıldı . LPS uygulaması ndan sonra yiyecekler geri çekildi. LPS enjeksiyonundan 0, 2, 4, 8 ve 24 saat sonra kuyruk boşluğundan kan alınıldı . Serumdaki alanin amino transferaz (ALT) ve trigliseridemi, Antech Diagnostics (Indianapolis, IN, ABD) tarafından ölçüldü.

#### İstatistik

Verileri istatistiksel olarak analiz etmek için Student t-testi kullanıldı .

#### SONUÇLAR

Farklı HA'ları n ana yapısal-fonksiyonel özellikleri Şekil 1 ve Tablo 1-4'te sunulmaktadır . Genel olarak, numuneler, farklı yapısal özelliklerin iyi bir dağılımını sunmuştur;



İNCİR. 1. Farklı numunelerin 13C nükleer manyetik rezonans spektrumları . Bireysel humik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandırıldı .

Tablo 1. 13C Nükleer Manyetik Rezonans ile Belirlenen Farklı Karbon Türlerinin Bağlı Bollukları (% olarak)

d (ppm)	Alkil C 0-45	O-alkil C 45-110	Aromatik C 110-160	Fenolik C 140-160	Karboksilik C 160-185	Karbonilik C 185-215
A	13,8	34,2	38,0	14,2	8,1	5,9
B	32,2	16,7	31,0	11,8	11,6	8,5
C	27,7	16,7	42,0	7,8	8,2	5,4
D	32,1	9,3	43,0	12,5	13,5	2,1
VE	11,1	35,2	50,9	21,8	2,3	0,5

Tablo 2. Hüyük Numunelerin Moleküler Ağırlık Dağılımı, Ya Ana Piklerin Maksimumuna Karşı Gelen Moleküler Ağırlık Olarak veya Tüm Pik Aralığına Karşı Gelen Moleküler Ağırlık Olarak İfade Edilir

Örnek	Ana zirveler (Da)	Aralık MW (Da)	Alan (%)
A	3,03 · 104	1,07 · 104 - 1,10 · 105	25
	1,33 · 104	8,11 · 103 - 2,23 · 104	22
	8,63 · 103	3,90 · 103 - 1,94 · 104	20
	4,30 · 103	6,50 · 102 - 2,13 · 104	33
B	2,69 · 104	1,35 · 104 - 5,91 · 104	22
	1,37 · 104	7,06 · 103 - 2,80 · 104	42
	7,60 · 103	3,75 · 103 - 1,54 · 104	14
	4,64 · 103	2,06 · 103 - 9,85 · 103	13
	2,21 · 103	7,46 · 102 - 5,46 · 103	9
C	2,68 · 104	1,21 · 104 - 6,88 · 104	21
	1,39 · 104	9,67 · 103 - 2,02 · 104	11
	8,26 · 103	1,41 · 103 - 5,07 · 104	65
	1,89 · 103	9,65 · 102 - 3,43 · 103	3
D	2,33 · 104	9,53 · 103 - 6,74 · 104	42
	5,96 · 103	5,97 · 102 - 4,91 · 104	58
VE	2,72 · 104	1,32 · 104 - 6,29 · 104	9
	1,49 · 104	7,61 · 103 - 3,12 · 104	28
	7,69 · 103	2,61 · 103 - 2,28 · 104	43
	2,45 · 103	9,20 · 102 - 5,65 · 103	20

MW, moleküler ağırlığı.

Tablo 3. Hüyük Asit Numunelerinin Spin Konsantrasyonları

HA	Sı kma/g
A	2,45 · 1018
B	5,17 · 1018
C	1,70 · 1019
D	1,70 · 1019
VE	2,93 · 1018

HA, hüyük asit.

Tablo 4. Farklı Hüyük Asit Örnekleri için Ana Fourier Dönüşümü Kırtızı İyotesi Spektroskopu Bantları

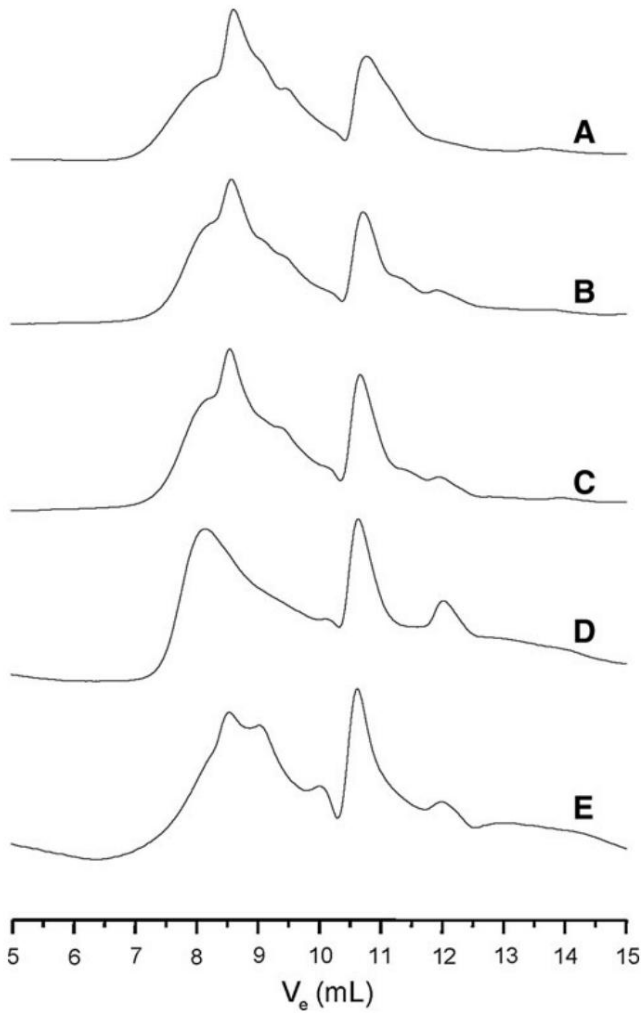
	m (cm <sup>-1</sup> )AB	C	D	VE
O-H germe	3400	++++	++++	++++
	3200	++	+++	+++
Alifatik C-H germe	2930	+	++	+
	2850	+	++	+
C-O COOH'nin gerilmesi	1700	++	++	+
Aromatik C-C titreşimi, H-O germe	1620	++	+++	+++
bağlı kinonların C'si				
O-H deformatsyonu ve fenolik OH'nin C-O gerilmesi	1400	++	++	++
Eterlerin C-O deformatsyonu	1100	+++	++	++
	1050	++	+	+

numune seti içindeki O-alkil-C ve fenolik ile ilgili gruplardaki nispi içeriğin dağılımı. MW'de önemli bir fark bulunmadı (Şekil 2; Tablo 2).

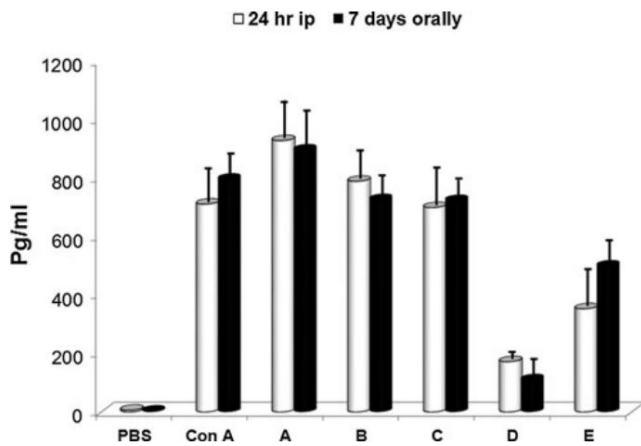
Hüyük numunelerin potansiyel farmakolojik etkilerinin araştırılmasıyla ilgili olarak, ilk olarak, HA'nın fare splenositleri tarafından IL-2 üretimi üzerindeki etkilerini ölçtük. Özellikle IL-2'yi ölçmemizin iki nedeni vardı: Birincisi, önceki makalemizde bu sitokine odaklandık ki10, bu da yeni numuneleri eski versiyonlarla karşılaştırmamıza olanak sağladı. İkincisi, çeşitli immün modülatörlerin çalısınmaları, IL-2'nin en sık uyarılan sitokin olduğunu gösterdi.

IL-2 üretimi, kontrol ve tedavi edilen farelerden izole edilen dalak hücrelerinin 72 saatlik bir in vitro inkübasyonundan sonra ölçülmüştür. Numuneler ya ip enjekte edildi ya da ağızdan verildi. Şekil 3'te özetlenen veriler, A, B ve C numunelerinin, Concanavalin A ile karşılaştırmalı olarak IL-2 salgılanmasını uyardığı ve numune E'nin orta düzeyde bir aktivite gösterdiğini göstermektedir. Numune D'nin neden olduğu stimülasyon vasattı, ancak uyarılmaması hücrelerin yalnızca marjinal üretimi nedeniyle (10 pg/mL'nin altında), yine de önemliydi. Oral veya enjekte edilen uygulama arasında önemli bir fark gözlenmedi.

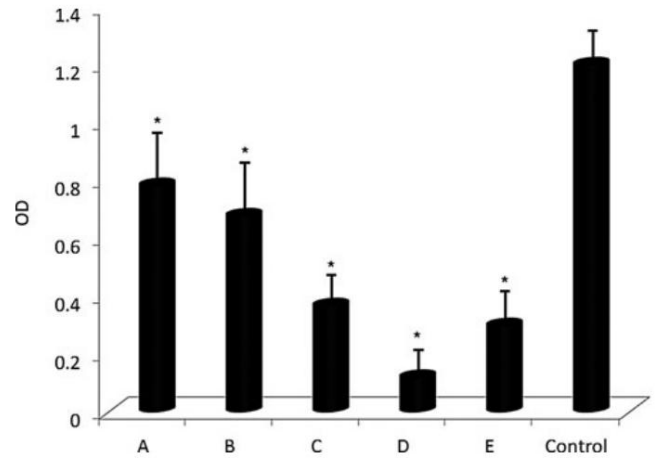
İlk deneylerden sonra, hüyük bağıştıklığı güçlendirilmesinde HA'nın rolüne odaklandık. Deneysel bir model olarak, ovalbumin ile aşılama kullandık. HA örnekleri, iki intraperitoneal antijen dozu ile birlikte uygulandı; Freund adjuvanı pozitif kontrol olarak kullanıldı. Sonuçlar (Şekil 4), tüm numunelerin spesifik anti-ovalbumin antikorlarını üretimini uyardığı, numune D'nin yine en düşük aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Bununla birlikte, örneklerin hiçbirinin hüyük bağıştıklığı Freund adjuvant düzeyine (OD 1.31 - 0.19) kadar güçlendirmediği belirtilmelidir.



İNCİR. 2. Yüksek performanslı boyut dışı şlama kromatografisi kromatogramları (Kı rı İma İndeksi Dedektörü). Bireysel hümik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandı rı İdi .



İNCİR. 3. İnterlökin (IL)-2 üretiminin intraperitoneal (ip) enjeksiyon veya oral olarak uygulanan hümik asit (100 ug) ile uyarı lması . Bireysel hümik asitlerde A, B, C, D ve E olarak adlandı rı İdi . Her değ er ortalama - standart sapmayı (SD) temsil eder. Kontrol fosfat tamponlu salin (PBS) grubunda IL-2 salgı lanması 10 pg/mL'nin altı nda olduğ undan, tüm farklı lı klar istatistiksel olarak anlamlı dı r.



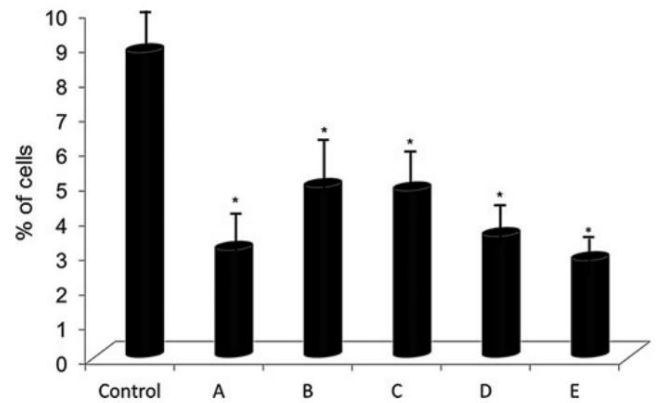
İNCİR. 4. İki ip hümik asit enjeksiyonunun ovalbumine karşı antikor oluşumu üzerindeki etkileri. Bireysel hümik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandı rı İdi . Farelere iki kez (2 hafta arayla) enjekte edildi ve son enjeksiyondan 7 gün sonra serum toplandı . Ovalbumine karşı spesifik antikorları n seviyesi, enzime bağı lı immünosorbent deneyi ile tespit edildi. Pozitif kontrol olarak Freund adjuvanı kullanı ldı . \*Kontrol (yalnı zca ov albumin) ve numuneler arası nda P < .05 düzeyinde önemli farklı lı kları temsil eder. Tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi.

HA'nı n biyolojik etkileri, numunelerle beslenmenin dalak hücrelerinde apoptozun erken evrelerinin nispi kı smı nda bir azalmaya neden olduğ u bulgusuyla daha da desteklenmiştir (Şekil 5).

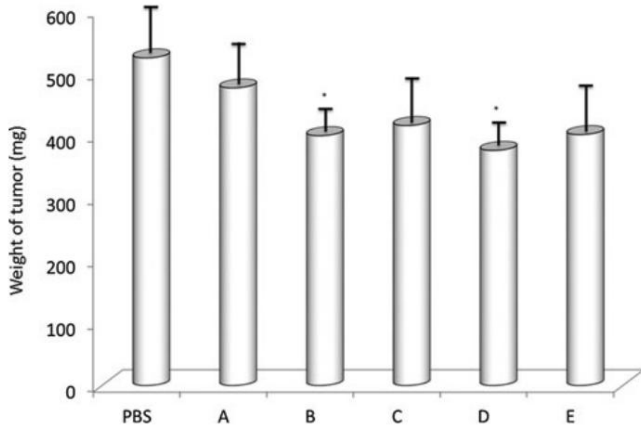
Lewis akciğer karsinomu hücrelerinin bir modelini kullanarak, HA numuneleri ile tedavinin (ya oral ya da intraperitoneal olarak uygulanan) orta derecede inhibisyona neden olduğ unu ve %20'ye ulaşt ı ğı nı gösterdik (Şekil 6). En yüksek inhibisyon B ve D numunelerinde bulundu.

Karşı laşt ı rı ldı ğı nda, 200 mg/kg'lı k bir konsantrasyonda ip olarak uygulanan inhibitör siklofosamid, %72 inhibisyona neden oldu.

Daha sonra dikkatimizi, 2 hafta boyunca HA (100 lg/fare) ile beslenmenin takip edildi ği deneysel olarak indüklenen hepatotoksositeye karşı koruyucu etkilere odakladı k.



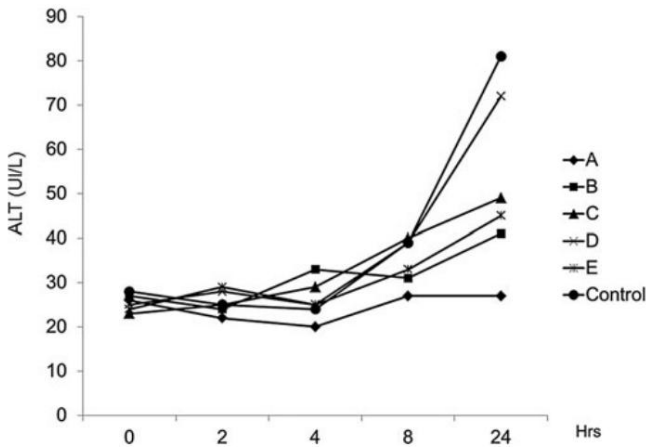
İNCİR. 5. Humik asit veya PBS ile beslenen farelerden izole edilen splenositlerdeki erken apoptoz fazı nı n nispi yüzdesi. Bireysel hümik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandı rı lması ş tı r. Farklı lı klar \*P < .005 seviyesinde önemlidir.



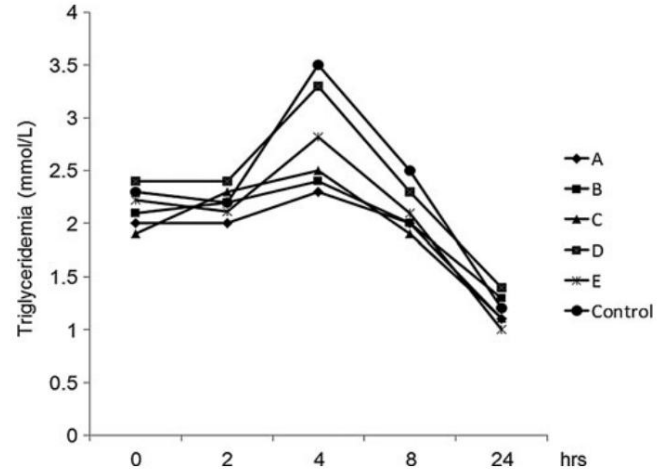
İNÇİR. 6. Lewis akciğer karsinoması olan C57Bl/6 farelerinin hümkik asit tedavisi. Üç deneyden elde edilen veriler gösterilmektedir. Her deney için fareler, belirtildiği gibi hümkik asit veya siklo fosfamide (CPA) tepki açısı ndan test edildi. CPA, tümör uygulaması ndan sonraki 10. günde kullanıldı ; hümkik asit numuneleri, tümör uygulaması ndan sonraki 0. günden 14. güne kadar oral olarak kullanıldı . Farelerin kontrol grubu günlük ip PBS aldı . Bireysel hümkik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandırıldı . Her değer ortalamayı temsil eder - SD. Tüm farklılıklar \*P < .05 düzeyinde anlamlıydı .

LPS'nin (10 mg/kg) ip enjeksiyonu ile. Verilerimiz (Şekil 7), serum ALT'deki artışı nı, numune A (%81 inhibisyon) ve B (%50 inhibisyon) tarafından ulaşılan en yüksek inhibisyon seviyesi ile tüm numuneler tarafından inhibe edildiğini gösterdi. LPS enjeksiyonu ayrıca kısa süreli bir trigliseridemiye (Şekil 8) neden oldu ve bu, HA ile beslenerek (özellikle A ve B numuneleri) %82'ye kadar inhibe edildi.

Yukarıdaki tüm sonuçlar, HA'nın biyolojik aktiviteleri güçlü bir şekilde etkilediğini öne sürdüğü için, normal yara iyileşmesi üzerindeki etkisini inceledik. Konfluent olarak büyütülen HaCaT tek tabakaları çizilerek yaralandı ve bu hücrelerin bir tek tabakayı yeniden oluşturma yeteneğini test etmek için HA numunelerinin varlığı nda inkübe edildi. Yaralanmadan yirmi dört saat sonra, HaCaT hücrelerinin HA ile tedavisi,



İNÇİR. 7. Bir kontrol diyeti (kontrol) ile beslenen veya hümkik asit numuneleri ile desteklenmiş farelerde lipopolisakarit yüklemesinden sonra serumdaki alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi. Bireysel hümkik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandırıldı . Değerler, 15 farenin ortalamasını temsil ediyor.

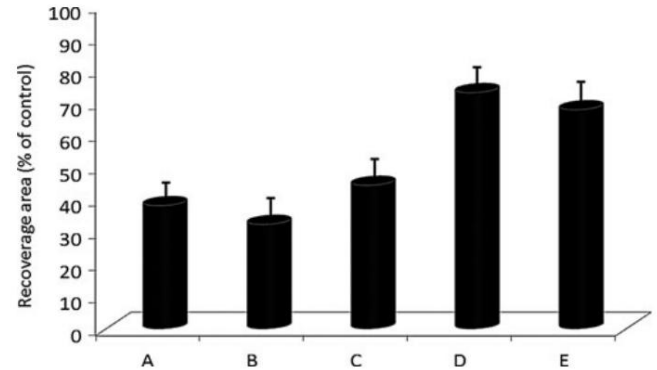


İNÇİR. 8. Bir kontrol diyeti (kontrol) ile beslenen veya hümkik asit numuneleri ile desteklenmiş farelerde LPS yüklemesinden sonra trigliseridemi. Bireysel hümkik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandırıldı . Değerler, 15 farenin ortalamasını temsil ediyor.

kontrol ile karşılaştırıldı . Şekil 9, optimal 1 ug/mL dozla elde edilen sonuçları göstermektedir.

#### TARTIŞMA

Turba şeklindeki HA'ların eski zamanlardan beri terapötik olarak kullanılması gerçeğine rağmen, biyolojik etkilerine ilişkin bilginiz oldukça sınırlıdır ve hatta çoğu zaman tartışmalıdır (Klocking tarafından gözden geçirilmiştir19). Önceki çalışmalar, HA'nın mayadan türetilen gluklan ile önemli sinerjistik etkilerini göstermiştir.10 Bu umut verici sonuçlara dayanarak, yeni bir HA numunesi setinin potansiyel biyolojik etkilerini daha fazla araştırmaya karar verdik.



İNÇİR. 9. Hümkik asidin HaCaT hücrelerinin sıfırdan yaralanmasından rejenerasyon üzerindeki etkisi. Konfluent HaCaT hücreleri çizikle yaralandı , yarı kandı ve sadece serumsuz bir ortamda (kontrol) veya hümkik asit numunelerinin (1 ug/mL) varlığı nda 24 saat boyunca yeniden oluşması na izin verildi ve fotoğrafları çekildi (A). Yaralanmanın birden çok fotoğrafı elde edildi ve görüntü analiz yazılımı kullanılarak hücre iyileşme alanlarını yüzdesi belirlendi. Hücresel geri kazanım alanını kontrolünkine göre yüzdesi ölçüldü. Üç başlı deneyin birleşik sonucu gösterilmiştir (B). Bireysel hümkik asitler A, B, C, D ve E olarak adlandırıldı .



HA dahil olmak üzere çeşitli immünomodülatör tiplerinin, sitokinlerin üretimini uyarma yeteneği ile birlikte bağı şı k lı k sistemi üzerinde hem doğrudan hem de dolaylı etkileri olduğu gösterilmiştir.10,19 vitro ve dört numunenin, kullanı lan uygulamadan bağı m s z olarak bu sitokinin salgı lanması nı güçlü bir şekilde uyardı ğı nı buldu.

Sitokinler, önemli hücreler arası iletişimcilerdir ve bağı şı k lı k sisteminin farklı bölümleri arası ndaki bilgi akı şı ndaki rollerinin, yeterli düzeyde savunma reaksiyonları için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, IL'lerin kanserdeki rolüne ilişkin hem kanser büyümesini önleyici işlevlerde hem de kanser büyümesini teşvik edici özelliklerde gösteren çok sayı da rapor mevcuttur.20 Kötü huylu ilerlemenin doğası karmaşı ktı r ve kötü huylu hücreler tarafı ndan üretilen sitokinler, otokrin büyüme faktörleri veya immünomodülatörler olarak işlev görebilir.

HA genellikle hücresele bağı şı k lı kta test edilmiştir ve hümorale dal üzerindeki potansiyel etkileri hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu nedenle, numunelerimizin potansiyel stimülasyonunu spesifik bir antikor tepkisi üzerinde karşı laştı rdı k. Sonuçları mı z, HA'nı n Freund adjuvanı kadar güçlü bir adjuvan olmaması na rağmen, bu etkilerin yine de önemli olduğunu (örnek D hariç) ve önceki çalı şmadakinden daha güçlü olduğunu gösterdi.10 Önceki deneylerimiz, meme kanseri büyümesinin inhibisyonu üzerinde olası etkiler önerdi. , ancak yalnızca gluklan varlı ğı nda.10 Bu nedenle, temelde farklı olan bu dört örneğin, gluklan varlı ğı olmadan Lewis hücrelerinin metastatik büyümesini önemli ölçüde engellediğini görmek ilginçti. Apoptozun uyarı lması , anti-neoplastik özelliklere sahip herhangi bir molekül için adaylardan biri olarak kabul edilir.21 Ancak, dalak hücrelerinin HA kaynaklı apoptozisi sonuçları mı z bu hipotezi desteklememektedir.

HA'nı n yara iyileşme süreci üzerindeki etkisinin araştırı lması na olanak sağlamak için basit bir çizik-yara modeli kullanı ldı . Eksojen olarak eklenen HA'nı n etkisi, tek tabakanı n yenilenmesi üzerinde test edilmiştir. HA'nı n varlı ğı nı n dikkate değer etkisini gördük. Bununla birlikte, HA'nı n yara iyileşmesinin rejenerasyon sürecini nasıl geliştirdiği tam olarak açı k değildir. HaCaT hücrelerinin proliferasyonunda herhangi bir artı şı n gözlenmediği gerçeğine dayanarak, sorumlu mekanizmanı n proliferasyonun otokrin stimülasyonu değil, sitokinlerin parakrin stimülasyonu olabileceğini tahmin edebiliriz.

LPS ile indüklenen hepatotoksisite, bireysel bileşenler tarafı ndan olası hepatoproteksiyonun test edilmesi için yaygın bir deneysel yaklaşı mdı r.22,23 Karaciğer, sepsis sonrası çoklu organ disfonksiyonunun gelişiminde önemli bir organdı r.24 Verilerimiz, LPS yüklemesinden sonraki glisemik prolife, benzer sonuçlarla korele olduğunu göstermektedir. Bosch ve ark.24 tarafı ndan açı klanan sonuçlar Hem geçici hipergliseminin hem de ALT düzeylerinin HA tarafı ndan düşürülmesi, açı k bir şekilde hepatoproteksiyonun bir işaretidir. VV ve AV'nin çı kar çatı şması yoktur; MF, RB, JMG-M. ve J.-CY, Timac Agro International tarafı ndan istihdam edilmektedir. Çalı şma kı smen Timac Agro (hümkik asit numunelerinin hazı rlanması , izolasyonu ve karakterizasyonu) ve kı smen de NIH hibesi #5R21CA141190-02 tarafı ndan finanse edildi.

Test edilen HA'nı n farmakolojik aktivitesi ile yapı sal özellikleri arası ndaki ilişki ile ilgili olarak sonuçlar, HA farmakolojik aktivitesinin doğrudan fenol grupları yla değil,

alifatik ve/veya aromatik alanlarda oksijen içeren alkil grupları (esas olarak karbonhidratlar). Bu anlamda, fenol ve oksijen fenolik ilişkili gruplarda en yüksek konsantrasyona sahip olan E numunesi, incelenen biyolojik parametreler üzerinde ilgili bir diferansiyel etki göstermedi. Aslı nda, genel olarak, çalı şı lan ana farmakolojik aktivitelerle ilgili etkinlik sı rası A >B>C> E > D şeklindeydi. Yalnızca yara iyileşmesinin rejenerasyon sürecinde, sı ra de ği şti: D >E >C>B> A. Bununla birlikte, A ile D'yi karşı laştı rdı ğı mı zda, A'nı n oksijen-alkil C konsantrasyonunun D numunesinden çok daha yüksek olduğunu, oysa fenol-C'nin nispi konsantrasyonunun D'de daha yüksek olduğunu ve nispi karboksilik konsantrasyonunun olduğunu gözlemledik. -C ve karbonilik-C birbirine benzerdi. Bu sonuç, oksijen alkil-C grupları nı n varlı ğı nı n HA'nı n temel farmakolojik etkilerini açı klamak için önemli olduğunu düşündürmektedir. O-alkil fonksiyonel grupları nı n doğası ile ilgili olarak, laboratuvarı mı zda yapı lan önceki çalı şmalar bunları n karbonhidratlarla ilgili olabileceğini düşündürmüştür.

Karboksilik ve karbonilik grupları n potansiyel tabanı ile ilgili olarak, A ve E yapı ları nı karşı laştı rdı ğı mı zda, A'nı n karboksilik-karbonilik fonksiyonel grupları n görece konsantrasyonunun daha yüksek olduğunu gözlemledik; ancak, A ve D arası nda fark yoktu. Bu sonuçlar, bu fonksiyonel grupları n hümkik biyolojik aktivite için gerekli olmasa da bazı roller oynayabileceğini gösterdi. Bu sonuç, B ve C yapı sal özelliklerinin A'nı nkilerle karşı laştı rı lması ndan elde edilen sonuçlarla desteklenmektedir. Böylece B, A'dan daha yüksek bir karboksilik karbonilik fonksiyonel grup konsantrasyonu sunmuştur ve C, A'nı nkine benzer değerler sunmuştur. Bununla birlikte, hem B hem de C, O-alkil-fonksiyonel grupları n daha düşük bir nispi konsantrasyonunu sunarak, bu yapı sal alanı n önemli rolünü vurgulamı ştı r.

Öte yandan, HA'ları n ana farmakolojik aktivitesi ile bunları n toplam alifasite veya aromatiklik derecesi, moleküler boyut dağı lı mı (görünür MW) ve kararlı serbest radikal içeri ği arası nda net bir ilişki yoktur.

Birlikte ele alı ndı ğı nda, bu sonuçlar, O-alkil ile ilgili fonksiyonel grupları n varlı ğı nı n, bu HA setinin ana farmakolojik etkilerinin ifadesinde önemli bir rol oynadı ğı nı göstermektedir. Bu fonksiyonel gruplar esas olarak karbonhidratları içerebilir. Bu gerçeğin, belirli karbonhidratları n bağı şı k lı k modülatörleri olarak rolü ile bazı ilişkileri olabilir.10,18,20 Verilerimizi özetlemek gerekirse, raporumuz

HA'ları n çok çeşitli pleiotropik biyolojik etkiler gösterdiğini öne sürüyor. Hepatoprotektif etkiler özellikle ilgi çekicidir ve bu etkilerin mekanizmaları nı açı klamaya çalı şan deneyler halen devam etmektedir.

#### YAZAR AÇIKLAMA BEYANI

VV ve AV'nin çı kar çatı şması yoktur; MF, RB, JMG-M. ve J.-CY, Timac Agro International tarafı ndan istihdam edilmektedir. Çalı şma kı smen Timac Agro (hümkik asit numunelerinin hazı rlanması , izolasyonu ve karakterizasyonu) ve kı smen de NIH hibesi #5R21CA141190-02 tarafı ndan finanse edildi. Finansörlerin çalı şma tasarı mı nda, veri toplama ve analizinde, yayı nlama kararı nda veya tasla ğı n hazı rlanması nda hiçbir rolü yoktu.

## REFERANSLAR

1. Andersen K, Hvingel B, Kleinschmidt, K, Korgensen T, Laurberg P: Geçiş halindeki bir Erktik toplumunun 50-69 yaşındaki sakinlerinde iyot atılımındaki değişiklikler ve frekansı n bir belirteci olarak iyot atılımındaki geleneksel Inuit yemeklerinin tüketimi. *Am J Clin Nutr* 2005;81:656-663.
  2. Bittner M, Janosek J, Hilscherova K, Giesy J, Holoubek I, Blaha L: Ag reseptörünün saf hümitik asitlerle aktivasyonu. *Environ Toxicol* 2006;21:338-342.
  3. Haanen BF: Turba Hakkında Gerçekler. Madenler Marka Yayınları, Can. Bölüm Madenler, Ottawa, 1924, s. 614-656.
  4. van Rensburg CEJ, van Straten A, Dekker J: Oksifulvik asidin antimikrobiyal etkinliğinin in vitro araştırılması. *J Anti mikrop Chemother* 2000;46:853-854.
  5. van Rensburg CEJ, Malfield SCK, Dekker J: Topikal oksifulvik asit uygulaması, farelerde kutanöz immün yanıtı baskı lar. *Drug Dev Res* 2001;53:29-32.
  6. Thiel KD, Helbig B, Klocking R, Wurtzer P, Sprossig M, Sweizer H: Tip 1 ve tip 2 insan herpes virüsüne karşı amonyum humatı n ve enzimatik olarak oksitlenmiş klorojenik ve kafeik asitlerin in vitro aktivitelelerinin karşı laştırılması. *Pharmazie* 1981;36:50-53.
- [ PMC ücretsiz makale ] [ PubMed ] 7. Joone GK, Dekker J, van Rensburg JCE: Oksihumatı n immün sistemi uyarıcı özelliklerinin araştırılması. *Z Doğa Araştırması* 2003;58c:263-267.
8. Vucskits AV, Hullar I, Bersenyi A, Andrasofszky E, Kulcsar M, Szabo J: Fulvik ve hümitik asitlerin sı çanlarda performans, bağı şıklık ve tiroid fonksiyonu üzerindeki etkileri. *J Eye Physiol Eye Nutr* 2010;94:721-728.
  9. Islam KMS, Schuhmacher A, Gropp JM: Hayvancılıkta hümitik asit maddeleri. *Pak J Nutr* 2005;4:126-134.
  10. Vetricka V, Baigorri R, Zamarrero AM, Garcia-Mina JM, Yvin JC: Glucan and humic acid: Synerjistic effects on the immun system. *J Med Gıda* 2010;13:863-869.
  11. Bernacchi F, Ponzanelli I, Minunni M, Falezza A, Loprieno N, Barale R: Doğal hümitik asidin in vivo sitogenetik etkileri. *Mutajenez* 1996;11:467-469.
  12. Hseu YC, Chen SC, Chen YL, Lee ML, Lu FJ, Wu FY, Lai JS, Yang HL: Kuyruklu yıldı z ve sisted kromatid değişim tahlili kullanılarak insan periferik kan lenfositlerinde hümitik asit kaynaklı genotoksitesite. *J Hazard Mater* 2008;153:784-792.
  13. Gau RJ, Yang HL, Chow SN, Suen JL, Lu FJ: Hümitik asit, NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla hücre yüzeyi yapışma proteinlerinin LPS kaynaklı ekspresyonunu baskı lar. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;166:59-67.
  14. Visser SA: Su, kara ve mikrobiyal kaynaklı fulvik ve hümitik asitlerin moleküler ağırlık fraksiyonları üzerine viskozimetrik çalı şmalar. *Bitki Toprağı* 1985;87:209-221.
  15. Breittkreutz D, Stark HJ, Plein P, Baur M, Fussenig NE: Retinoik asit ve hücre dışı Ca<sup>2+</sup> ile ölümsüzleştirilmiş (HaCaT) ve tümörjenik insan derisi keratinositlerinde (HaCaT-ras) epidermal keratinizasyonun farklı modülasyonu. *Farklı laşma* 1993;54: 201-217.
  16. Kogan G, Sandula J, Korolenko TA, Falameeva OV, Poteryaeva ON, Zhanaeva SY, Levina OA, Filatova TG, Kaledin VI: Bir makrofaj stimülatörüne karboksimetil gluklan ile Lewis akciğer karsinoma kemoterapisinin artan etkinliği. *Int Im Munopharmacol* 2002;2:775-781.
  17. Vashishta A, Saraswat-Ohri S, Vetrickova J, Fusek M, Ulrichova J, Vetricka V: Keratinosit büyümesinin yeni bir düzenleyicisi olan HaCaT keratinosit hücreleri tarafından salgılanan Procatepsin D. *Eur J Cell Biol* 2007;86:303-313.
  18. Neyrinck AM, Mouson A, Delzenne NM: Fermente edilebilir bir deniz b (1-3) gluklan olan laminarin ile diyet takviyesi, hepatik dokuda immün yanıtı modüle ederek sı çanda LPS tarafından indüklenen hepatotoksitesiteye karşı korur. *Int Immunopharmacol* 2007;7:1497-1506.
  19. Klocking R: Potansiyel terapötik maddeler olarak hümitik maddeler. İçinde: Küresel Ortamdaki Humik Maddeler ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri, Senesi N, Miano, TM, eds. Elsevier, Amsterdam, 1994, s. 1245-1257.
  20. Bittencourt VC, Figueiredo RT, da Silva RB, Mourao-Sa DS, Fernandez PL, Sasaki GL, Mulloy B, Bozza MT, Barreto Bergter E: Pseudallescheria boydii'nin bir a-glukanı mantar fagositozunda ve toll benzeri reseptörde yer alması r aktivasyon. *J Biol Chem* 2006;281:22614-22623.
  21. Mocellin S, Wang E, Marincola FM: Tümör mikroçevresinde sitokinler ve bağı şıklık tepkisi. *J Immunother* 2001;24: 392-407.
  22. Suzuki T, Takahashi T, Yamasaki A, Fujiwara T, Hirakawa M, Akagi R: Hem oksidaz-1'in (HO-1) ve spesifik olmayan delta-aminolevulinat sentazı n (ALAS-N) dokuya özgü gen ekspresyonu septik çoklu organ disfonksiyonu sendromunun sı çan modeli. *Biochem Pharmacol* 2000;60:275-283.
  23. Sheth K, Bankey P: Bağı şıklık organı olarak karaciğer. *Curr Opin Crit Care* 2001;7:99-104.
  24. Bosch MA, Gardia R, Pagani R, Portoles MT, Diaz-Laviada I, Abarca S, Ainaga MJ, Risco C, Municio AM: Sı çanlarda Escherichia coli lipopolisakarit tarafından tersinir şokun indüksiyonu. Serum ve hücre zarı parametrelerindeki değişiklikler. *Br J Exp Pa hol* 1988;69:805-812.