

## HÜMİK ASİDİN ANTI-FUNGAL AJAN OLARAK KULLANIMI

Bu çalışmada, Afşin-Elbistan gıyrtjası ndan üretilen hümik asitler ile anti-fungal bir ürün üretme üzerinedir. Bu çalışmada, iltihaplanmanın veya viral enfeksiyonlarının tedavisine değinmektedir. Hümik maddeler doğada her yerde bulunabilen çevredeki bitki ve hayvan kalıntıları nın bozulması ndan ortaya çıkmaktadır (MacCarthe ve diğerleri, 1990). Bu maddeler pH'ın bir fonksiyonu olarak sudaki çözünürlüğe dayanarak hümik asit, fulvik asit ve humin olarak kı sımllara ayrı labilir. Fulvik asit, tüm pH koş ulları nda suda çözünen fraksiyonudur. Ağır lık bakı mı ndan daha düş üktür ve hümik asitlerden daha düş ük renk yoğunluğuna sahiptir.

Hümik maddeler genelde akarsu suyundaki çözünmüş organik karbon konsantrasyonlarını nın %50'sini oluş turur, bunların %90 ila %95'i fulvik asittir. Hümik asitler topraklarda fulvik asitlere göre daha fazla bulunurken (Stevenson, 1982) fulvik asitlerin hümik asitlerden suda 9-10 kat daha fazla miktardadır (Malcolm, 1985). Hümik asitler aş ağı dakilerin tedavisinde baş arıyla kullanı lması ş tır:

- (i) İnsanlardaki hiperasitlik ve diğer gastrik rahatsız lıkla (Reichert, 1966, Gramsch, 1961)
- (ii) İltihaplar (Salz 1974, Motohisa ve diğerleri, 1974)
- (iii) kansızlık ve hiperkolesterolemi (Soloveyva and Lotosh 1984)
- (iv) Von Willebrand (kanama) hastalığı (Lopez-Fernandez et al., 1992)

İnsani ve hayvansal hastalıkları n tedavisinde hümik asitin olası uygulanması ş imdiye kadar değişik hastalıklar üzerinde araşt ırılması ş tır. Wang ve ark. (1996) hümik asitler ve aktif oksijen serbest radikalleri arasındaki etkileş imi incelemiş ve turba hümik asitlerinin hem süperoksit hem de hidroksil radikalini temizleyebildiğini tespit etmiş lerdir. Ayrıca, fulvik asitlerin sı çan ince bağı rsağı ndan mutajenlerin emilimini klorlu suda bulunan yüksek derecede bir mutajenik olan furanonu in vitro sı çan bağı rsak kesesi sistemi kullanarak önlediği gösterilmiştir (Clark ve Chipman, 1995).

Birleşik Devletler Patentleri No. 4,999,202 ve 5,204,368 aktif muhteviyat olarak bir hümkik asit, tuzu veya türevi içeren bakteriyel ve bakteriyostatik özelliklere sahip kompozisyonlar açıklanmaktadır. Bu bileşimler, dezenfektanlar olarak faydalı olarak tanımlanmaktadır.

Bu çalışma mamıza göre, aktif bileşen olarak hümkik asit, tuz, veya türev içeren farmasötik bir kompozisyon sağlanmıştır.

Farmasötik kompozisyon kişiye lokal uygulama için sağlanabilir. Topikal uygulama durumunda, bileşim, bir çözelti, macun, merhem, toz veya topikal uygulama için uygun herhangi bir başka formda sağlanabilir. Hasta bir insan ya da bir hayvan da olabilir.

Ayrıca, çalışma mamıza göre, hümkik asit, tuzu veya türevinin, kandida gibi fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanımı sağlanabilir.

Hümkik asit tercihen ABD patenti 4,912,256'da tarif edilen tipte bir ıslak kömür oksidasyon yönteminden türetilen bir hümkik asittir.

Bergh ve ark. (1997) hümkik asit içinde çoğunlukla karboksilik asitler olan yaklaşık 50 farklı bileşik tespit etmiştir. Bileşikler, çoğunlukla sıradan fizyolojik metabolitlerdir, ürün karışımında herhangi bir toksik bileşik bulgusu yoktur.

Hümkik asitin tipik fonksiyonel grup analizi aşağıda verilmektedir:

Toplam asit grupları	: 11,5 - 15,5 meq/g
Karboksilik gruplar	: 2,3 - 3,7 meq/g
Fenolik gruplar	: 8,5 - 12,5 meq/g

Çalışmamızın sonucu oluşan formülde, insana veya hayvana topikal uygulamada hümkik asit solusyonda kütleli olarak %25-60'u ihtiva eder.

## HÜMİK ASİTİN İNMMUN FONKSİYONLARININ IN VITRO ETKİLERİ

Hümik asidin insan nötrofilleri tarafından sağlanan oksidanların üretimi üzerindeki etkileri

İnsan nötrofilleri, hümik asit (12.5 ve 25 µg/ml'de) ile 37°C'de 15 dakika süreyle muamele edilmiştir. Hücreler, PMA (forbol miristat asetat) (20 ng/ml) ile uyarılmış ve süperoksit üretimi, ferrisitokrom C'nin (1 mM) süperoksit-inhibe edilebilir redüksiyonunun ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Test edilen her iki konsantrasyonda süperoksit üretiminde belirgin bir inhibisyon gözlenmiştir (Tablo 1).

TABLO 1

Hümik asidin PMA ile aktive edilen nötrofil süperoksit üretimi üzerine etkileri

Tedavi	nmoles süperoksit/106 nötrofiller /10 min*
Kontrol	0,072
Uyarılmış (+PMA)	
Kontrol	67.2
+hümik asit (12.5 µg /ml)	59
(25 µg/ml)	43
* iki verinin ortalaması	

TABLO 2

Hümik asidin süperoksit temizleme faaliyetleri

25 ug/ml.

nmoles süperoksit

\*

---

---

Kontrol	55.95
Hümik Asit	41.25

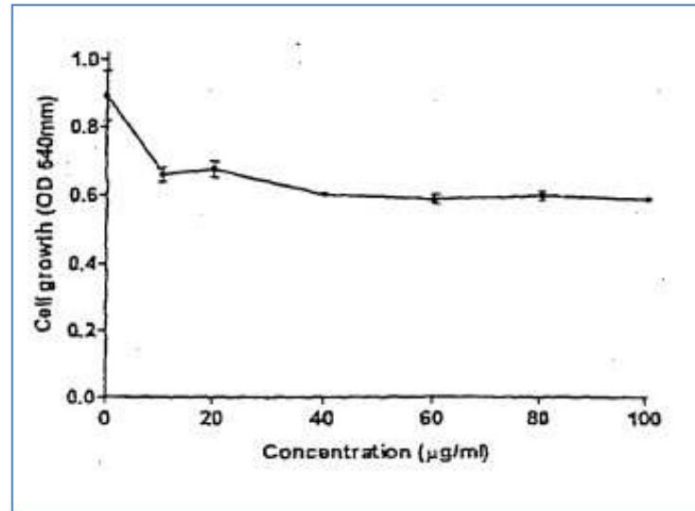
---

\* iki verinin ortalaması

Hümik asidin süperoksit temizleme aktiviteleri (25 µg/ml'de), hipoksantin (1 mM) / ksantin oksidaz (100 mM/ml) enzimatik sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Hümik asit süperoksit temizleme etkisi Tablo 2'de görülmektedir.

Hümik asidin karışık bir lenfosit kültürünün proliferatif yanıtı üzerindeki etkileri

Deney ajanı seri seyreltmelerinin varlığı ve yokluğunda iki farklı donörün lenfositlerini birlikte 7 gün boyunca kültürleyerek gerçekleştirilmiştir. Hümik asit, doza bağlı olarak hücre büyümesini engellemiştir (Şekil 1).



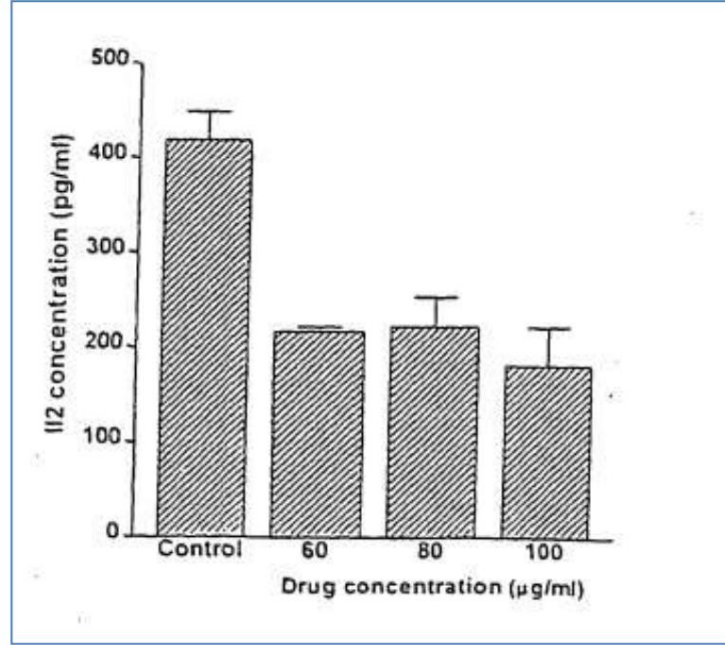
Şekil 1. Konsantrasyona göre hücre büyümesi

Hümik asidin insan lenfositleri tarafından interlökin 2 (IL-2) üretimi üzerine etkileri

Fitohemaglutinin (PHA) uyarımıyla insan lenfosit kültürleri hümik asit ile 2 gün süreyle 60, 80 ve 100 µg/ml'de işleme tabi tutulduktan sonra hücreler santrifüj edilmiş ve süpernatant, bir Biotrak TM insan interlökin 2 ELISA sistemi kullanılarak IL-2 seviyeleri için denenmiştir.

(Amersham International Plc, Buckinghamshire, İngiltere).

Hümik asit, test edilen üç konsantrasyonda uyarı lenfositlerin IL-2 üretiminde istatistiksel olarak önemli bir düşüşe neden olmuştur (Şekil 2).



Şekil2. İlaça göre IL2 konsantrasyonu

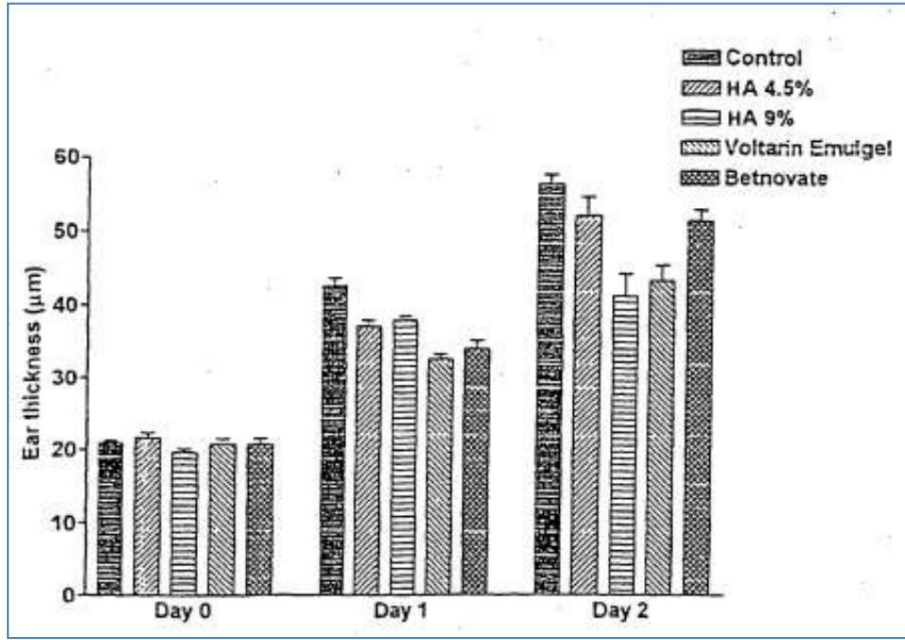
#### HÜMİK ASİTİN ANTI-İNFLAMATUAR BİLEŞİMİ OLARAK IN VIVO DEĞERLENDİRİLMESİ

2,4-dinitro-1-fluorobenzen (DNFB) duyarlı farelerde hümik asit (topikal olarak uygulanan %4.5 ve %9 krem) etkileri, 50 BALB C dişi fareler (6-7 haftalık) yöntemine göre değerlendirilmiştir (Rheins ve arkadaşları, 1987). Fareler DNFB'nin tıraşlı karın bölgesine uygulanması ile duyarlı hale getirilmiş, 5 gruba bölünmüş ve 6 gün sonra sağ kulaktan verilmiştir. Her bir gruptaki farelerin iltihaplı kulakları, aşığıdaki kremlerden biri, yani kontrol kremi, %4,5 hümik asit, %9 hümik asit, %15 diklofenak sodyum (Voltaren Emulgel®) ve %0.1 betametazon (Betnovate®) ile iki gün boyunca topikal olarak muamele edilmiştir. Kulak kalınlığı, uygulamadan önce saat ölçer ile ölçülmüş, 24 ve 48 saat sonra belirlenmiştir.

Dört tedavi de her iki günde iltihaplanmada belirgin bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 3).

Bu sonuçlar, işlem sonlandıktan ve etkilenen kulaklar parafin mumuna yerleştirildikten

sonra mikroskopik olarak teyit edilmiş tir.



Ş ekil3. Hüyük asitin (HA) diğer ilaçlarla kulak iyileş mesinde kı yaslamaşı

İki hüyük asit kremiyle iki günlük tedavi sı rası nda herhangi bir toksisite belirtisi gözlemlenmemiş tir.

Aynı çalı ş tı rmadan sonraki ardı ş ı k günlerde örneklenen farklı serilerden farklı sürülerle elde edilen hüyük asit yi ği nları ndan türetilen kremler arası ndaki muhtemel değiş imi incelemek için bir deney de gerçekteş tirilmiş tir. Bu çalı ş mada, grup baş ı na 5 fare olmak üzere 7 grup kullanı lmı ş tı r. Birinci gruba kontrol kremi, diğer 6 gruba ise yukarı da tarif edilen 6 farklı %9 hüyük asit krem grubu uygulanmı ş tı r. Yine, hüyük asit kremleri ile muamele edilen iki gün boyunca herhangi bir toksisite belirtisi gözlemlenmemiş tir. Önceki deneydeki gibi benzer sonuçlar elde edilmiş tir. Hüyük asit, bir kez daha, bu modelde iltihaplanmanı n istatistiksel olarak önemli bir inhibisyonuna neden olmuş tur. Farklı hüyük asit kremleri ile elde edilen sonuçlar üzerinde varyans analizi yapı lmı ş tı r. Birinci günde P değerı 0.131, ikinci gün 0.771'dir. Bu nedenle, test edilen çeş itli numuneler arası nda anlamlı bir fark olmamı ş tı r.

Bir araş tı rma da hayvanlar üzerinde yapı lmı ş tı r. Araş tı rmaya on klinik vaka uygulanmı ş tı r. Bu araş tı rmaya yürütebilmek için hayvanları n cildi üzerinde ş u hastalı klar oluş turulmuş tur:

sivilce, eritema (cilt iltihabı ), pruritis (kaşıntı) ve piyogenesis (irin). Lezyonlar tedavi öncesi hafif veya şiddetli olarak sınıflandırılmıştır. Araştırmasında başka hiçbir tedaviye izin verilmemiştir. Hayvan sahiplere %9 hümkik asit kremi verilmiş ve etkilenen bölgelere günde iki kez krem uygulanması talimatı verilmiştir. Bu tedavi yedi gün devam etmiştir. Tedavi başlamasından sonra hayvan sahiplerinden tam olarak yedi gün sonra dönmeleri istenmiş ve olgular klinik, biyopsi ve fotoğraflarla yeniden değerlendirilmiştir. Bundan sonra tarif edilen histopatolojik incelemeden görülebileceği gibi, incelenen 10 hastanın hepsinde patolojik olarak olduğu kadar klinik olarak da azalan inflamasyon gözlemlenmiştir. Olguların hiçbirinde yan etki görülmemiştir. Çoğu durumda, lezyonların çözünürlüğünün tam olduğu ve tekrarlamadığı kaydedilmiştir. Yalnızca kronik ve uzun süredir devam eden bir vakada köpeğin hala geniş çapta kaşıntı yapması nedeniyle sahibi 3 gün sonra geri dönmüştür. Daha sonra kısa etkili bir kortizon uygulanmış ve köpek olumlu tepki vermiştir.

Alerjik dermatit ve egzama lezyonlarına sahip klinik olgular Tablo 3'de gösterildiği gibi farklı hayvan türlerinde tespit edilmiştir.

TABLO 3

Klinik bilgiler		
Lab no	Tedavi grubu	Türler
3973 A1	Kontrol	Ev kedisi
3973 A2	Tedavi	Ev kedisi
3973 B1	Kontrol	Köpek (Bull Mastiff)
3973 B2	Tedavi	Köpek (Bull Mastiff)
3973 C1	Kontrol	Köpek (Bull dog)
3973 C2	Tedavi	Köpek (Bull dog)
4991 A1	Kontrol	Köpek (Dalmation)
4991 A2	Tedavi	Köpek (Dalmation)
4991 B1	Kontrol	Köpek (Maltese)
4991 B2	Tedavi	Köpek (Maltese)
4991 C1	Kontrol	Köpek (St. Bernard)
4991 C2	Tedavi	Köpek (St. Bernard)
4991 D1	Kontrol	Köpek (Maltese)
4991 D2	Tedavi	Köpek (Maltese)

Kontrol lezyonlarını (tedavi öncesi) yaklaşık 3 mm'lik biyopsi toplandı, formalinde sabitlenmiş ve tedaviden önceki biyopsinin alanına olabildiğince yakını biopsilerle takip edilmiştir. Formalin ile sabitlenmiş cilt biyopsileri, histolojik araştırmalar için kullanılan

standart rutin yöntemlere göre iş lenmiş , parafin mumu içine gömülmüş ve her biri 6 µm'lik dilimler hazı rlanmı ş tı r. Tüm dilim Haemotoxillin ve Eozin boyama yöntemi kullanı larak renklendirilmi ş tir.

#### Histopatolojik bulgular

Histopatolojik bulgular Tablo 4'te gösterilmi ş tir. Kontrol numuneleri, baş langı ta Tablo 4'te gösterildiği gibi derecelendirilen morfolojik lezyonlar için araş tı rı lmı ş tı r. Tedavi edilen lezyonları n biyopsileri benzer ř ekilde değerlendirilmi ş tir. Her vakada, her bir lezyonun orijinal kontrol lezyonuyla karş ı laş tı rı labileceği akı lda tutulmalı dı r; çünkü özel etiyoloji ve morfolojik değiş iklikler her bir vakada farklı lı k göstermi ş tir.

Bu sonuç lar sadece histopatolojik gözlemler olarak yorumlanmalı dı r. Bu sonuç lar, tedavi edilen lezyonları n klinik gözlemlerine ek olarak sunulmuş tur. Genel olarak ve yukarı da bahsedilen sı nı rlamaları göz önünde bulundurarak tedavi edilen lezyonlarda iyileş me ve iltihaplanma azalmı ř gibi görünmektedir. Yüzey (sı ğ) eksudatif dermatit (akut iltihaplanma) her vakada iyileş meyi hızlandı rı mı ş tı r. Hiperplastik epidermis (akantoz), kronik bir durumdur ve bu nedenle tedavi sonrası nda çok az değiş iklik gösterir. Dermal inflamasyon derecesi, tedavi edilen lezyonlardan biri hariç , orijinal tedavi edilmemiş lezyonlarla karş ı laş tı rı ldı ğı nda da azalmı ş tı r.



TABLO 4

Histopatolojik bulgular: Klinik denemeler	
Vaka 3973 A1: Kontrol yara	Yüzey eksudatif dermatit (3+) ülseratif (3+) Dermal iltihap (2+)
Vaka 3973 A2: Tedavi edilmiş yara	Yüzey eksudatif dermatit (-) Ülseratif (-) Dermal iltihap (1+)
Vaka 3973 B1: Kontrol yara	Hiperplastik epitel (3+) Hiperpigmentasyon (2+) Dermal iltihap (3+)
Vaka 3973 B2: Tedavi edilmiş yara	Hiperplastik epitelya (-) Hiperpigmentasyon (1+) Dermal iltihap (1+)
Vaka 3973 C1: Kontrol yara	Yüzey eksudatif (3+) Hiperplastik epidermis(3+) Dermal iltihap (3+)
Vaka 3973 C2: Tedavi edilmiş yara	Yüzey eksudatif (-) Hiperplastik epidermis (3+) Dermal iltihap (1 +)
Vaka 4991A1: Kontrol yara	Ulserasyon ve eksudasyon (2+) Epidermal hiperplastik (2+) Dermal iltihap (2+)
Vaka 4991A2: Tedavi edilmiş yara	Ulserasyon ve eksudasyon (-) Hiperplastik epidermis (1+) Dermal iltihap (1 +)
Vaka 4991 B1: Kontrol yara	Yüzey eksudasyon (2+) Hiperplastik epidermis (2+) Dermal iltihap (2+)
Vaka 4991 B2: Tedavi edilmiş yara	Yüzey eksudasyon (-) Hiperplastik epidermis (2+) Dermal iltihap (2+)
Vaka 4991 C1: Kontrol yara	Yüzey eksudatif dermatit (3+) Ulserasyon çı ban (2+) Epidermal hiperplastik (2+) Dermal iltihap (3+)
Vaka 4991 C2: Tedavi edilmiş lezyon	Yüzey eksudatif dermatit (-) Ulserasyon çı ban (-) Epidermal hiperplastik (3+) Dermal iltihap (1+)
Derleme 4991 D1: Kontrol yara	Epidermal hiperplastik (3+) Dermal iltihap (3+)
Vaka 4991 D2: Tedavi edilmiş yara	Epidermal hiperplastik (3+) Dermal iltihap (1+)
- yok, 1+ hafif, 2+ orta, 3+ şiddetli	

## DENEYSEL HAYVANLARDA ZEHİRLİLİK ÇALIŞ MALARİ

Hümik asitin güvenliğini ve çok düşük toksisitesini ispatlamaya yarayan akut ve kronik toksisite çalışmaları defekten yapılmıştır. Hümik asit solüsyonu (%25.4 konsantre) ve hümik asit krem (5,33'ü içerecek şekilde formüle edilmiş) akut oral ve dermal toksisite çalışmaları, akut dermal ve göz tahriş çalışmaları, cilt hassaslaşım çalışmaları ve subkronik oral ve dermal toksisite çalışmaları değerlendirilmiştir. Araştırmaları n sonuçları Tablo 5 ve 6'da özetlenmiştir.

TABLO 5

%25,4 Hümik asit zehirlilik çalışmaları		
Çalışma no	Çalışma Türü	Sonuçlar
1388	Sıçanlarda akut oral toksisite	LD50 değeri > 3380 mg/kg LD50
1389	Sıçanlarda akut dermal toksisite	değeri > 5712 mg/kg Tahrişsiz
1390	Akut dermal tahriş	Tahrişsiz Zayıf cilt
1391	Akut göz iritasyonu	hassaslaşım testi Test edilen en
1392	Cilt hassaslaşım testi	yüksek doz 1000 mg/kg/ gün. Öüm
1520	Sıçanlarda subkronik oral toksisite (90 günlük çalışma)	ya da hasta hayvan yok. Kan kimyası nda hafif değişiklikler ve vücut kitlelerinde hafif azalmalar mevcut.
1530	Sıçanlarda subkronik dermal toksisite (90 günlük çalışma)	Test edilen en yüksek doz 1000 mg/kg / gün (etken maddenin). Öüm ya da hasta hayvan yok. Kan kimyası nda hafif değişiklikler ve vücut kitlelerinde hafif azalmalar mevcut.

TABLO 6

%5,33 Hümik asit zehirlilik çalışmaları		
Çalışma no	Çalışma Türü	Sonuçlar
1393	Sıçanlarda akut oral toksisite	LD50 değeri > 4147 mg/kg LD50
1394	Sıçanlarda akut dermal toksisite	değeri > 8599 mg/kg Hafif tahriş
1395	Tavşanlarda akut dermal iritasyon	
1396	Tavşanlarda akut göz iritasyonu Tahrişsiz Kobaylarda deri	
1397	hassasiyeti Hafif cilt hassaslığı Sıçanlarda subkronik toksisite (90 Test edilen	
1512	en yüksek doz 1000 mg/kg/ gün. Öüm ya da hasta hayvan yok. günlük çalışma)	Uygulamada kan kimyası nda hafif değişiklikler ve lokal tahriş .

Veriler, akut dermal veya oral maruz kalma testleri sırasında hiçbir ürünün ölçülebilir toksisite üretmediğini göstermektedir. Her iki maddeyle yapılan alt-kronik oral ve dermal toksisite çalışmaları sırasında çok yüksek dozlar kullanılmıştır. Hayvanlara hümik asit 1000 mg/kg /gün etkin doz ile verilmiştir. Sıçanlara %5,33'lük hümik asit krem 1.0 mg/kg /gün dozunda 90 gün uygulanmıştır. Anormal klinik bulgular gözlemlenmiş ve hiçbir hayvan çalışmada ölmemiştir. Test maddesini alan hayvanlardaki klinik patolojide ve vücut kitlelerinde meydana gelen değişiklikler nispeten küçük olmuştur.

#### Ürün Formülü

Hümik asit %50

ÇAY %10

Etil alkol %40

Formüldeki maddeler bir mikserde 1 saat boyunca karıştırılır.

#### Referanslar

1. Bergh JJ, Cronjé IJ, Dekker J, Dekker TG, Gerritsma ML ve Mienie L. 1997. Olmayan su-bulamaç kömürün oksijenle katalitik oksidasyonu: fulvik asitlerin tanımlanması ve akut toksisite. *Yakıt*, 76 (2):149-154.
2. Clark NN, Chipman JK. 1995. 3-kloro-4-(diklorometil)-5-hidroksinin emilimi 2[5H] furanon (MX) sıçan ince bağırsağından in vitro. *Toxicol Lett*, 81(1): 33-38.
3. Gramsch H. 1961. Gastronomi tedavisine bir katkı. *Adet dönemi* 15:658-687.
4. Lopez-Fernandez MF, Blanco-Lopez MJ, Castineira MP, Batlle J. 1992. Ayrıca anormal bağlanması ile von Willebrand hastalığına resesif kalıtımı için kanıt von Willebrand çarpanından faktör VIII'e. *Am J Hematol*, 40:20-27.
5. MacCarthe P, Clapp CE, Malcolm RL, Bloom P R. 1990. Topraktaki hümik maddeler ve ekin bilimleri: seçilmiş okumalar. International Humic tarafından düzenlenen bir sempozyumun bildirileri maddeler Derneği, Amerika Soil Science Society, American Society of Agronomi ve

- Crop Science Society of America, Chicago, Illinois, 2 Aralık 1985.
6. Malcolm RL. 1985. Akarsu fulvik ve hümik maddelerin jeokimyası s. 181-209. Aiken GR ve diğerleri (ed.) içinde Toprak, tortu ve sudaki humik maddeler: Jeokimya izolasyonu ve karakterizasyonu. Wiley-Interscience, New York.
7. Motohisa S, Yoshinori H, Shuzo K. 1974. Cilt bozuklukları nı n tedavisi için hümik asitler, içinde: CA 80, s. 283 100222u, Japonya Patenti. Kokai 7392, 524.
8. Peng A, Xu L Q. 1987. Humik asidin kimyasal ve biyolojik selenyumun özellikleri çevre. Sci Total Environ, 64(1-2):89-98.
9. Reichert B. 1966. Modern terapide hümik asitler ve türevleri. Dtsch Apoth, 18:204-206.
10. Rheins LA, Barnes B, Amornsiripanitch S, Collins CE, Nordlund JJ. 1987. Bastırma topikal prostaglandin uygulaması nı takiben kutanöz immün yanıt PGE2.
11. Salz H. 1974. Salhummin jel, hiperemik ile lokal bir terapötik ajan, antiinflamatuvar ve analjezik etki. Aylık Med, 28:548-530.
12. Solovyeva Baş kan Yardı mcı sı , Lotosh T D. 1984. Biyolojik olarak aktif turba maddeleri vücut direnci uyarı cı lar. Dublin, İrlanda. 7. Uluslararası Turba Kongresi Tutanakları , 4, 428-434.
13. Stevenson FJ. 1982. Humus kimyası : Oluş um, bileş im, reaksiyonlar. Bölüm 9. Hümik maddelerin reaktif fonksiyonel grupları . Wiley-Interscience, New York.
14. Wang C, Wang Z, Peng A, Hou J, Xin W. 1996. Fulvik asitler arası ndaki etkileş im farklı kökenler ve aktif oksijen radikalleri. Sci China C Life Sci, 39(3): 267-275.