

HÜMİK MADDELERİN UV-B KORUYUCU ETKİSİ TEMEL OLUŞTURUR

Turba Rujunun Geliştirilmesi İçin

Yvonne Seel, Monika Guhr, Renate Klöcking, Roland Schubert, Jürgen I. Schoenherr

Proses Geliştirme Enstitüsü Turba ve Doğal Ürünler Uygulamalı

Bilimler Üniversitesi Zittau/Görlitz, Theodor-Körner-Allee 16, D-02763 Zittau, Almanya, Telefon: +49

3583 61 2316, e-posta: [yseel@hs-zigr.de](mailto:yseel@hs-zigr.de)

## ÖZET

Antiviral ve UV-B koruyucu etkileriyle bilinen hümkik asitler (HA), UV'nin neden olduğu uçuk tekrarlama riskini en aza indirmesi ve hatta önlemesi gereken bir fotokoruyucu ruj geliştirmek için umut verici adaylar olarak kabul edilir.

Bu çalışmada, geliştirilmekte olan ürün için en uygun UV emici bileşenleri bulmak için doğal HA, sentetik HA benzeri maddeler ve diğer ruj bileşenlerinin UV/VIS spektrumları analiz edilmiştir. Sonuçlar, UV-B aralığında tüm HA'ların beklenen yüksek absorpsiyon derecesini gösterir, ancak UV-A aralığında belirli farklılıkları ortaya çıkarır. Ayrıca, matris bileşenlerinin rujun toplam UV-B emilimine katkısını kanıtlanmıştır. UV maruziyetinden 24 saat sonra elde edilen sonuçlar, test edilen HA'nın, UV-B emici referans madde olarak kullanılan p-aminobenzoik asidin (PABA)kine benzer, doza bağlı önemli UV-B koruyucu etkilerini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: hümkik maddeler, UV-A absorpsiyonu, UV-B absorpsiyonu, UV koruyucu etki, U937 hücreleri

## GİRİŞ

Dünya yüzeyine ulaşan güneş ışığı, %52 görünür ışık, %42 kızılötesi radyasyon, %5,6 UV-A ve %0,4 UV-B radyasyonundan oluşan geniş bir spektruma sahiptir. UV-B radyasyonunun insan cildi için hem olumlu hem de olumsuz etkileri vardır. Bir yandan ciltte melanin oluşumunun aktivasyonu ve cildi UV ışınlarına karşı doğal bir güneşlik gibi koruyan gecikmiş pigmentasyonun gelişimi için gereklidir. Öte yandan, UV-B radyasyonuna uzun süre maruz kalmak ciltte eritem, güneş yanığı ve uzun süreli bir etki olarak cilt kanserini tetikleyebilen mutajenik DNA lezyonlarının oluşumuna neden olabilir. UV-B radyasyonu ayrıca, herpes simplex virüs tip 1'in neden olduğu tekrarlayan bir viral enfeksiyon olan herpes labialis'in yeniden aktivasyonu için önemli bir provokasyon faktörüdür.

Hümkik maddeler, UV soğurma özellikleriyle bilinirler ve melanine belirli yapısal benzerlikler gösterirler. Bakterilerde (Bitton ve diğerleri, 1972; Muela ve diğerleri, 2000) ve insan hücrelerinde (Hübner 2004; Klöcking ve diğerleri, 2004; Kühn, 2005) UV radyasyonuna karşı etkili oldukları kanıtlanmıştır. Ayrıca hümkik maddeler, çeşitli DNA ve RNA virüslerine karşı antiviral olarak aktiftir (Klöcking ve diğerleri, 2006) ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir (Klöcking ve diğerleri, 1968).

## 14. Uluslararası Turba Kongresi

Hümik maddelerin UV koruma etkisinin pratik önemi, şu anda UV ışığıyla herpes-simpleks virüsünün yeniden aktivasyonunu önlemek için bir rujda fotokoruyucu maddeler olarak hümik maddeleri hedefleyen BMBF destekli araştırma projesi 'Peat ruj'da incelenmektedir.

## MALZEMELER VE YÖNTEMLER

## test maddeleri

Analiz edilen numuneler, Altteich Peat'ten (Kuzey-Doğu Saksonya) 0,1 mol/l sodyum hidroksit ile ekstrakte edilen doğal hümik asitlerdir. Ayrıca kafeik asit (Na-KOP 466), hidrokafeik asit (Na-HYKOP) ve 3,4-dihidroksifenilalaninin (DOPA-OP) oksidasyonu ile hazırlanan sentetik hümik maddeleri analiz ettik (Klöcking ve diğerleri, 2006). Bir linyit kömürhümik asidinin (Humintech, Düsseldorf, Almanya) sodyum tuzu olan Humin Feed ve hint yağı da ayrı ayrı veya birbirleriyle kombinasyon halinde incelenmiştir.

Paraaminobenzoik asit (PABA), UV-B emici referans madde olarak görev yaptı (Klöcking ve ark. 2004).

## Absorpsiyon Tayini

96 oyuklu mikrolakalar UV-Star® (Greiner Bio-One GmbH) kullanılarak UV-Vis spektrumları, mikrolakalar için Synergy HAT Multimode okuyucu (BioTek) spektrofotometre ile analiz edildi. Tüm örnekler üç konsantrasyonda (10, 100 ve 1000 ug/ml) ve 0.7 mm'lik (100 ul) bir katman kalınlığında ölçülmüştür.

## Hücre kültürü

İnsan hücre dizisi U937, %10 FBS içeren RPMI 1640 ortamında yetiştirildi ve %5 CO2 içeren, nemli bir atmosferde 37°C'de inkübe edildi. Hücre sayısını belirlemek için, Neubauer sayım haznesinde hücre süspansiyonunun 100 ul'si sayıldı. Tripan mavisi ile canlı / ölü boyama, canlı hücreleri renksiz, ölü hücreleri mavi lekeli gösterir. Hücre sayısını, RPMI ortamı eklenerek 5 x 10<sup>5</sup> hücre/ml'ye ayarlandı.

## UV ışınlaması ve UV kaynaklı hücre hasarı ve UV korumasını belirlenmesi

Hücreler, mikroışılmalı kontrollü cihaz Bio-Sun (Vilber Lourmat) kullanılarak ışınlandı.

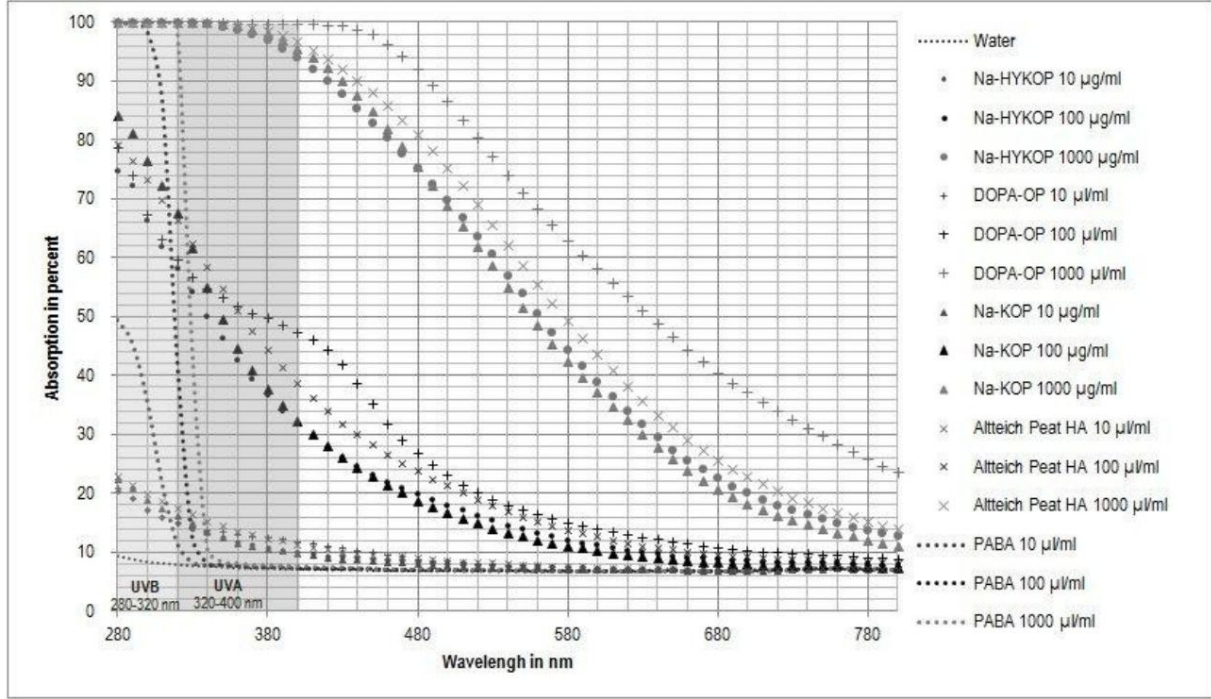
Bu amaçla, her biri 100 ul hücre süspansiyonu, 96 oyuklu düz tabanlı bir mikrotitre plakasını oyuklarına aktarıldı. Işınlamadan önce, birincil (alt) plakasını üzerine UV-şeffaf 96 oyuklu bir plaka (UV-Star®) yerleştirildi. Oyukları her biri 100 ul hümik madde seyreltmesi ile dolduruldu. "Çift plaka", maksimum 312 nm dalga boyunda ve 80 mJ/cm<sup>2</sup> ışınlama dozunda UV-B radyasyonuna maruz bırakıldı. Daha sonra hücre kültürleri %5 CO2/37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bunu, üreticinin spesifikasyonlarına göre XTT tetrazolyum indirgeme tahlili (Roche Diagnostics) kullanılarak hücre toksisitesinin belirlenmesi takip etti. Mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından üretilen formazanın optik yoğunluğu (OD), 37 °C'de 450 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 620 nm) 3 saatlik inkübasyondan sonra ölçülmüştür. UVB koruma etkisi (PE), ölçülen OD değerlerinden aşağıdaki denklemle hesaplandı :

$$PE = \frac{OD_{kontrol} - OD_{ışınlanmış}}{OD_{kontrol}} \times 100, \text{ burada } x_0, \text{ ışınlanmamış hücre kontrollerinin OD'sidir, } x_1,$$

hümik maddelerle ışınlanmış hücreler ve  $x_0$  ışınlanmamış, ışınlanmamış hücrelerin OD'sidir.

## SONUÇLAR

Ş ekil 1, analiz edilen hümk asitlerin ve para-aminobenzoik asidin 280 ve 800 nm arası ndaki UV-VIS spektrumları nı göstermektedir.

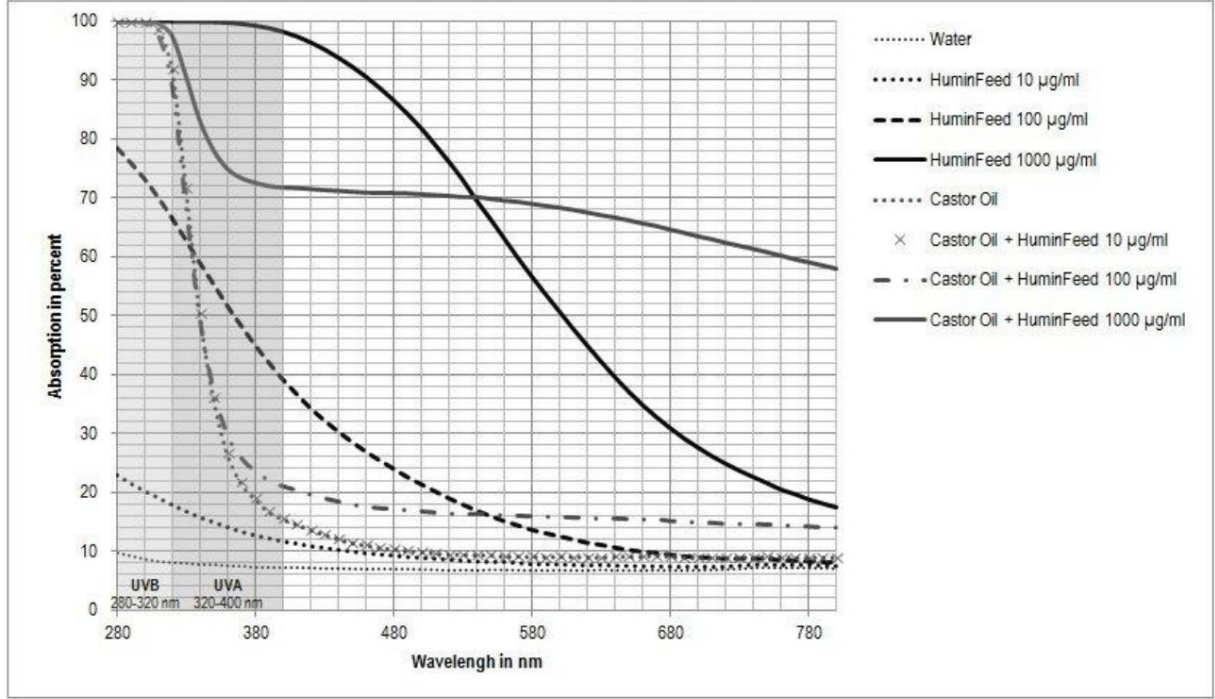


Ş ekil 1. HYKOP, DOPA-OP, Na-KOP 466, Alteich Peat HA ve PABA'nı n absorpsiyon spektrumları (280-800 nm); test maddesi konsantrasyonları : 10, 100 ve 1000 µg/ml; katman kalı nlı ğı 0,7 mm.

Hümk asitlerin spektrumları beklenen tipik eğrileri göstermektedir. Spektrumun daha yüksek enerjili (daha kı sa dalga boyu) alanları nda yüksek absorpsiyon ve daha düş ük enerjili alanlarda (uzun dalga boyları ) giderek daha az absorpsiyon ile karakterize edilirler. Öç üen üç hümk madde konsantrasyonu, iyi tanı nan üç eğri grubu tarafı ndan yansı tı lı r. Buna karş ı lı k, PABA, maksimum yaklaş ı k 280 nm'de önemli bir UV absorpsiyonuna sahiptir, ancak UVA radyasyonunu neredeyse hiç absorbe etmez. 100 µg/ml konsantrasyonlardaki hümk maddeler yüzde 60 (320 nm) ila 84 (280 nm) UV-B ve yaklaş ı k yüzde 50 (360 nm) UVA emer. Test edilen en yüksek konsantrasyonda (1000 µg/ml) test hümk maddeleri, UV-B ı ş ı ğ ı nı n tamamen filtrelenmesini sağ lar ve UVA'nı n yüzde 95'inden fazlası nı emer, bu sayede DOPA-OP'nin en etkili olduğu kanı tlanmı ş tı r.

Ş ekil 2, deneysel olarak kullanı lan iki ruj bileş eninin (Humin Feed ve hint yağ ı ) yanı sı ra her ikisinin üç kombinasyonunun spektrumunu sunar. Hint yağ ı , genellikle bu yağ ı n yüzde 50 ila 70'ini içeren rujları n temel matris bileş enlerinden biridir. Maksimum 269 nm'de nispeten yüksek bir UV emilimi ile karakterize edilir, ancak görünü r ş ı ğ ı neredeyse hiç emmez. Soru, ç ubuktaki yüksek konsantrasyonu nedeniyle hint yağ ı nı n bir bütün olarak ruj matrisinin UV emilimini etkileyip etkilemediğiydi. Hümk maddelerin aksine, yağ saf, seyreltilmemiş sı vı olarak ölç ümü ş tür.

## 14. Uluslararası Turba Kongresi

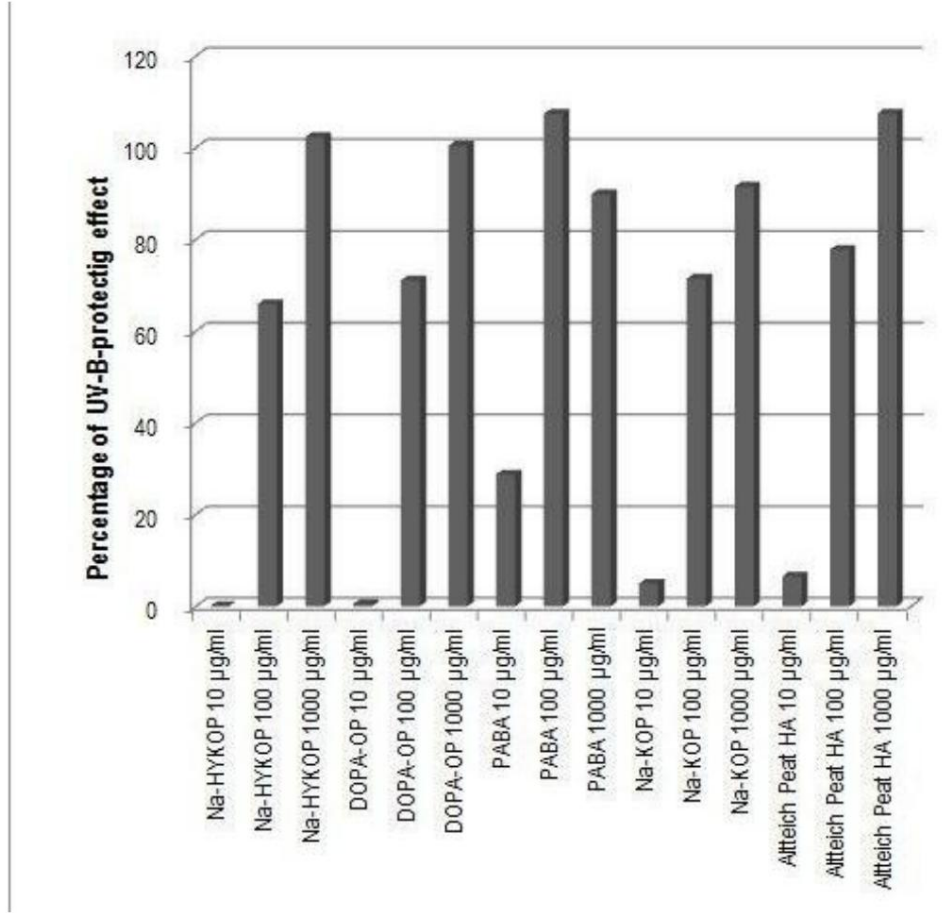


Ş ekil 2. Humin Yemi, Hint Yağı ve çeş itli Humin Yemi ve Hint Yağı karış ı mları nı n absorpsiyon spektrumları (280-800 nm); Humin Yem konsantrasyonları : 10, 100 ve 1000 µg/ml; katman kalı nlı ğı 0,7 mm.

Ş ekil 2'de gösterildiği gibi, linyit hümk asit Humin Feed'in absorpsiyon eğrileri, Ş ekil 1'deki Altteich turba hümk asidininkilere büyük ölçüde karş ı lı k gelir. Bununla birlikte, Humin Feed'in hint yağı ile kombinasyonundan elde edilen veriler, ş aş ı rtı cı bir tablo göstermektedir. 100 ve 1000 µg/ml Humin Feed'in UV-A absorpsiyonu bariz bir ş ekilde azalı rken, >560 nm dalga boyları nda absorpsiyon bariz ş ekilde artar. Bu, hint yağı nı n hümk asitlerle reaksiyonu sonucunda önceden bilinmeyen yeni bileş iklerin oluş umunu gösterebilir. UV soğurucu maddeler ve matris bileş enleri arasındaki etkileş imlerin daha ayrı ntılı bir analizi büyük ilgi görmektedir ve gelecekteki çalı ş maları n konusu olacaktır.

Araş tı rmaları n bir sonraki adı mında, insan U937 hücrelerinde HYKOP, DOPA OP, Na-KOP 466, Altteich Peat HA ve PABA'nı n UV koruyucu etkisini inceledik. Kühn'e (2005) göre, hücrelerin ve test maddelerinin, test maddesiyle olası etkileş imlerden bağı msız olarak UV filtreleme etkisini değerlendirmemizi sağlayan iki ayrı plakaya yerleş tirildiği bir test düzenlemesi kullandı k. Sonuçlar ş ekil 3'te gösterilmiştir tir.

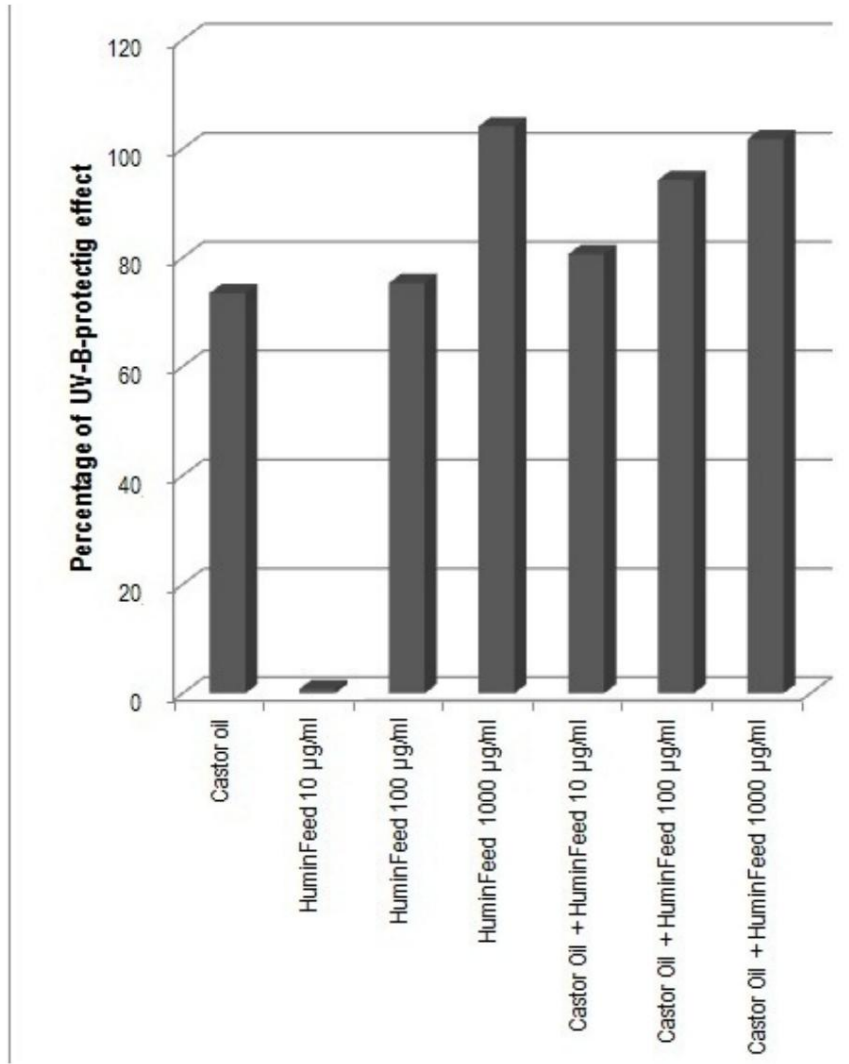
Düş ük konsantrasyonlarda (10 µg/ml) Na-KOP ve Altteich Peat HA, ı ş ı nlamadan 24 saat sonra hücreler üzerinde çok az koruyucu etkiye sahiptir. Buna karş ı lı k, 100 ve 1000 µg/ml konsantrasyondaki tüm hümk maddeler U937 hücrelerini yüzde 60'tan fazla korur. 100 µg/ml'deki PABA, hücreleri UV kaynaklı hasara karş ı tamamen koruyabilir. 1000 µg/ml'lik en yüksek test konsantrasyonunda hümk asitler de neredeyse tam bir UV koruması sağlar.



Ş ekil 3. U937 hücrelerinde HYKOP, DOPA-OP, Na-KOP 466, Altheich Peat HA ve PABA'nın UV-B koruyucu etkisi; Iş ı nılamadan 24 saat sonra XTT testi;

Kahverengi kömür humik asit Humin Feed benzer bir davranışa iş aret eder (Ş ekil 4). UV koruma etkisi 10 g/ml'de ihmal edilebilirken, 100 µg/ml'de yaklaşık %75'tir ve en yüksek test maddesi konsantrasyonunda (1000 µg/ml) %100'e ulaş ır.

Ş ekil 4, hint yağı nın tek baş ına hücreleri UV-B ışı nılamasına karşı yaklaşık %73,5 oranında koruduğunu göstermektedir. Yaklaş ık %80 oranında hint yağı na az miktarda Humin Feed (10 µg/ml) eklenerek etki artır ılı r. Bir sonraki konsantrasyon adı mında (100 µg/ml Humin Feed), karış ım neredeyse %95 UV koruması sağlar. Tam UV korumasına, hint yağı içeren ve içermeyen 1000 µg/ml Humin Feed ile ulaş ıldı . Bundan, UV koruma derecesinin, UV-B emici yağların mevcudiyetinden özellikle düşük ve ortalama humik madde konsantrasyonlarında fayda sağlayabileceği sonucu çıkar.



Ş ekil 4. Humin Feed ve HuminFeed-Hint Yağı Karışımının UV-B koruyucu etkisi, ışık şiddetinden 24 saat sonra üst plaka kuyucuklarındaki optik yol uzunluğu 0,7 mm ile 0,7 mm madde.

## SONUÇLAR

UV-koruyucu turba ruj geliştirmeyi hedefleyerek, insan hücre kültürlerinde UV-Vis absorpsiyonunun yanı sıra UV-koruyucu etkileri için iki doğal hümk asit ve üç sentetik hümk asit benzeri madde üzerinde çalışıldı. Bu çalışmaların sonuçları aşağıdaki sonuçlarla tutarlıdır.

İlk olarak, test edilen tüm hümk maddeler UV-B'yi ve bir dereceye kadar UV-A radyasyonunu da güçlü bir şekilde absorbe edebilir.

İkinci olarak, elde edilen UV absorpsiyon spektrumları, hücre kültürlerinde uygun hümk maddelerin UV-B koruyucu etkisi ile iyi ilişkilidir.

Üçüncüsü, sıradan bir ruj bileşeni olarak saf hint yağı, UV-B radyasyonunu daha yüksek bir dereceye kadar emer ve ayrıca insan hücrelerine UV koruyucu bir etki uygular. Kahverengi kömür hümk asit Humin Feed hint yağı ile kombinasyon halinde hümk asitlerin UV-B emilimini destekler, ancak UV-A emilimini azaltır. Bireysel ruj bileşenleri arasındaki muhtemelen altta yatan moleküler etkileşimleri aydınlatmak gelecekteki çalışmaların bir amacı olacaktır.

## 14. Uluslararası Turba Kongresi

### TEŞ EKKÜRLER

Çalı ş malar Alman Federal Eğitim ve Araş tırma Bakanlığı ğı tarafı ndan finanse edilmektedir. Bu çalı ş malara imkan sağladı ğı için Prof. Dr. rer. nat. habil. Roland Schubert.

### REFERANSLAR

Bitton, G., Henis, Y. ve Lahav, N. (1972). Çeş itli kil mineralleri ve hümik asidin ultraviyole ış ınlamaya maruz kalan Klebsiella aerogenes'in hayatta kalması üzerine etkisi. Uygulamalı Mikrobiyoloji 23, 870-874.

Huebner, KV (2004). Doğal hümik asitlerin ve hümik asit benzeri polimerlerin UVB radyasyonunun hücreye zarar veren etkisi üzerindeki etkisi. Tez, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Tıp Fakültesi, Bonn, Almanya.

Klöcking, R., Helbig, B., Poerschmann, J. ve Wutzler, P. (2006). Hümik asitlerin antiviral gücü FH Frimmel ve G. Abbt-Braun (editörler), Hümik Maddeler - Yapı yı Fonksiyonlara Bağlamak. Uluslararası Humik Maddeler Topluluğunun 13. Toplantı sı Tutanakları , Karlsruhe, Almanya 30 Temmuz -4 Ağustos 2006, s. 397-400. Su kimyası alanı nda bir dizi yayı n, Karlsruhe Üniversitesi'ndeki Engler-Bunte-Institute, Cilt 45-I.

Klöcking, R., Hofmann, R. ve D. Mücke (1968). Humatları n anti-enflamatuar etkisi üzerine hayvan deneyleri. İlaç Araş tırması 18, 941-942.

Klöcking, R., Kühn, S. ve Klöcking, H.-P. (2004) Doğal turba humik asitlerinin ve para-aminobenzoik asidin (PABA) UV-B koruyucu etkisinin karşı laş tırılması . J. Pävänen'de (ed.) 12. Uluslararası Turba Kongresi Bildirileri, Tampere, Finlandiya, 6-11 Temmuz 2004, s. 421-425. Uluslararası Turba Derneği.

Kühn, S. (2005) Hümik asitlerin UV-B koruyucu etkisinin mekanizması nı n in vitro olarak araş tırılması . Tez, Matematik, Doğa Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi, Martin Luther Üniversitesi Halle-Wittenberg, Halle, Almanya.

Muela, A., Garcí a-Bringas, JM, Arana, I. ve Barcina, I. (2000) Hümik malzemeler, zararlı parlak radyasyona maruz kalan Escherichia coli'ye ış ık tan koruyucu etki sunar. Mikrobiyal Ekoloji 40, 336-344.