

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**ŞEFTALİ ÇEKİRDEĞİ YAĞI İÇEREN KREMLERİN DERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Ecz. Çağdaş DUTLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN

MERSİN - 2014

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞEFTALİ ÇEKİRDEĞİ YAĞI İÇEREN KREMLERİN DERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ecz. Çağdaş DUTLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN

Tez No : 265

MERSİN – 2014

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

“Farmasötik Teknoloji” Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Şeftali Çekirdeği Yağı İçeren Kremlerin Deri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” adlı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 08 / 08 / 2014

N. Bergişadi

Prof. Dr. Nazan BERGİŞADİ

Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

Bekir Ufuk Halli

Yrd. Doç. Dr. Bekir Ufuk HALLI

Yeni Yüzyıl Üniversitesi,

Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Nefise Özlen Şahin

Prof. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN

Mersin Üniversitesi,

Eczacılık Fakültesi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 12.08.2014 tarih ve 2014/191 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

İmza Mühür

Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ
Enstitü Müdürü



TEŞRKÜRLER

Tezim ve diğer çalışmalarım sırasında benden değerli bilgi, deneyim ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Prof. Dr. Sayın N. Özlen şahin'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında emeği geçen Güney Ecza Kooperatifi yönetiminde beraber çalıştığım yönetici büyüklerime, Doğal Destek A.ř de beraber çalışma fırsatı bulduğum Sayın Zekeriya Temizel ve ekibine, Yüksek Lisansa başladığım ilk günden itibaren her türlü desteği esirgemeyen Selime Toka Ziylan ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son Olarak Sevgisini, desteğini benden hiç esirgemeyen, tez çalışmamın ve hayatımın her aşamasında yanımda olan başta EşİM olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK	ii
KABUL VE ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v-x
GEREÇ VE YÖNTEM	x
BULGULAR	xii
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Deri	5
2.2. Derinin Embriyolojisi	6
2.3. Derinin Histolojisi	6
2.4. Derinin Tabakaları	7
2.4.1. Deri Histolojik Olarak Üç Tabakadan Oluşmuştur	7
2.4.1.1. Epidermis	7
2.4.1.1.1. Bazal (germinatif) Tabaka (St Bazale)	8
2.4.1.1.2. Spinozum (Malpighi) tabakası (St. spinozum)	9
2.4.1.1.3. Granüler tabaka (St. granülozum)	10
2.4.1.1.4. Lusidum tabakası (St. lusidum)	10
2.4.1.1.5. Korneum tabakası (St. korneum)	11
2.4.1.3. Dermisin hücresel elemanları	13
2.4.1.3.1. Retikülohistiyositik hücreler	14
2.4.1.3.1.1. Fibroblastlar. Dış Etkenlere Karşı Koruma Görevi	14
2.4.1.3.1.2. Histiyositler	14
2.4.1.3.1.3. Mast hücreleri	14
2.4.1.3.2. Myeloid hücreler	15
2.4.1.3.3. Lenfoid hücreler	15

2.4.1.4. Derinin damarları	15
2.4.1.4.1. Derinin kan damarları	15
2.4.1.4.2. Lenf damarları	16
2.4.1.5. Derinin sinirleri	16
2.4.1.5.1. Duyu sinirleri	16
2.4.1.5.2. Motor sinirler	17
2.4.1.6. Keratinize deri ekleri	17
2.4.1.6.1. Kıllar	17
2.4.1.6.2. Tırnaklar	17
2.4.1.7. Salgı yapan deri ekleri	18
2.4.1.7.1. Ter Bezleri:	18
2.4.1.7.1.1. Ekrin ter bezleri	18
2.4.1.7.1.2. Apokrin ter bezleri	19
2.4.1.7.2. Yağ Bezleri	20
2.4.1.7.3. Subkutan Tabaka (Subkutis)	21
2.4.1.8. Derinin Görevleri	22
2.4.1.8.1. Koruma Görevi	22
2.4.1.8.1.1. Üst deri	22
2.4.1.8.1.2. Alt deri	23
2.4.1.8.2. İç Etkenlere Karşı Koruma Görevi	23
2.4.1.8.3. Dış etkenlere karşı koruma görevi	23
2.4.1.8.3.1. Biyolojik etkenlere karşı koruma	23
2.4.1.8.3.2. Fiziki etkenlere karşı koruma	23
2.4.1.8.3.2.1. Mekanik etkenler	24
2.4.1.8.3.3. Kimyasal etkenlere karşı koruma	24
2.4.1.8.3.4. Depo Görevi	24
2.4.1.8.3.5. Duyu Organı Görevi	24
2.4.1.8.3.6. Absorbsiyon ve Rezorpsiyon Görevi	24
2.4.1.8.3.6.1. Perkutanöz absorbsiyon	25
2.4.1.8.3.6.2. Penetrasyon	25
2.4.1.8.3.6.3. Permeasyon	25
2.4.1.8.3.6.4. Resorpsiyon	25
2.4.1.8.3.7. Perkutanöz absorpsiyonun önemi	25

2.5. Deri Yaşlanması	26
2.5.1. Deri Yaşlanmasının Çeşitleri	27
2.5.1.1. Kronolojik Yaşlanma	27
2.5.1.2. Foto yaşlanma	28
2.5.2. Yaşlanmış Derinin Histolojik Özellikleri	30
2.5.2.1. Epidermis	30
2.5.2.2. Dermis	31
2.6. Anti-aging Tedavi Yöntemleri	32
2.6.1. Farmakolojik Ajanlar	33
2.6.1.1. Güneşten koruyucular	33
2.6.1.2. Hidrokinon	34
2.6.1.3. Retinoidler	35
2.6.1.4. Antioksidanlar	36
2.6.1.4.1. Vitamin E (α -tokoferol)	36
2.6.1.4.2. Vitamin C (Askorbik asit)	37
2.6.1.4.3. Selenyum	37
2.6.1.4.4. Çinko	38
2.6.1.4.5. Melatonin	38
2.6.1.4.6. Yeşil çay	38
2.6.1.4.7. N-Furfuryladenin e (Kinerase)	38
2.6.2. Cilt Soyma (Peeling)	39
2.6.3. Lazerler	39
2.6.4. Dolgu Maddeleri	40
2.6.5. Botoks	41
2.7. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	41
2.7.1. Serbest Radikaller	42
2.7.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri	43
2.7.1.2. Lipit Peroksidasyonu (LP)	46
2.7.1.2.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması	47
2.7.1.2.2. Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları	48
2.7.1.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Hasarının Dokular Üzerine Etkileri	49
2.7.2. Antioksidanlar	51

2.7.2.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar	52
2.7.2.1.1. Süperoksit Dismutaz	52
2.7.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz	53
2.7.2.1.3. Glutasyon Redüktaz	53
2.7.2.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST)	54
2.7.2.1.5. Katalaz	55
2.7.2.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar	55
2.7.2.2.1. Antioksidan Vitaminler	55
2.7.2.2.2. Albümin	58
2.7.2.2.3. Bilirubin	58
2.7.2.2.4. Transferin ve Laktoferrin	58
2.7.2.2.5. Serüloplazmin	58
2.7.2.2.6. Ürik Asit	59
2.8. Hücre Kültürü	59
2.8.1. Kültüre İnsan Hücreleri	60
2.8.2. Kültüre Edilmiş İnsan Hücrelerinin Avantaj ve Dezavantajları	62
2.8.3. Hücre Kültürünün Genel Durumları	63
2.8.4. Biyolojik Aktivitenin Ölçümü	64
2.8.5. Kültüre Hücreler ile Biyokimyasal Ölçümler	65
2.8.6. Deri Yaşlanması ve Anti-aging Araştırmalarında <i>in vitro</i> Modellerin Kullanılması	65
2.9. Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar	66
2.9.1. Merhem	67
2.9.2. Krem	67
2.9.3. Losyon	67
2.9.4. Sera	67
2.9.5. Pasta	68
2.9.6. Merhem Sıvağları	68
2.9.7. Merhem sıvağlarının sınıflandırılması	69

2.9.7.1. Hidrokarbon sıvağları	69
2.9.7.2. Absorpsiyon sıvağları	70
2.9.7.3 Anhidr olup su tutabilen sıvağlar	70
2.9.7.3.1. Susuz lanolin	70
2.9.7.3.2. Hidrofil Vazelin	70
2.9.7.4. S/Y Tipinde Emülsiyon Oluşturabilen Sıvağlar	70
2.9.7.5. Suyla Yıkanabilen Sıvağlar	71
2.9.7.6. Suda Çözünen Sıvağlar	71
2.9.8. Merhemlerin Kullanım Amacına veya Farmakolojik Etkilerine Göre Sınıflandırılması	71
2.9.8.1. Keratolitik Etkili Eerhemler	71
2.9.8.2. Keratoplastik Etkili Merhemler	72
2.9.8.3. Antiseptik Merhemler	72
2.9.8.4. Antipüriritik Merhemler	72
2.9.8.5. Lokal Anestezik Etkili Merhemler	72
2.9.8.6. Lokal Analjezik Etkili Merhemler	72
2.9.8.7. Yumuşatıcı/Nemlendirici Özelliği Olan Merhemler	73
2.9.8.8. Koruyucu Merhemler	73
2.9.8.9. Sistemik Etkili Merhemler	73
2.9.9. Merhem Sıvağından Etkin Maddenin Salımına Etki Eden Faktörler	74
2.9.9.1. Sıvağa Ait Faktörler	74
2.9.9.1.1. Sıvağın Cinsi ve Özellikleri	74
2.9.10. Örnek Formülasyonlar	74
2.9.10.1. Kold Krem Formülasyonu	74
2.9.10.2. Hidrofilik Krem Formülasyonu	75
2.10. Nemlendiriciler	76
2.10.1. Nemlendiricilerin Kullanım Amacı	76
2.10.2. Nemlendiricilerin Sınıflandırılması	77
2.10.2.1. Öklüzifler (Örtücüler)	77

2.10.2.2. Hümektanlar	79
2.10.2.3. Emoliyanlar	79
2.10.2.4. Protein Yenileyiciler	79
2.11. Şeftali	80
2.11.1. Şeftali Çekirdeği Yağı	81
2.12. Çalışmanın Amacı	83
2.13. Süperkritik Karbondioksit (SC-CO2) Ekstraksiyonu Yöntemi	83
2.13.1. Süperkritik Akışkan Nedir?	83
2.13.2. Süperkritik Akışkanların Özellikleri	84
2.13.3. Süperkritik Karbondioksit	86
2.13.4. Kısaca Karbondioksitin Özellikleri Şöyle Özetlenebilir	87
3. GEREÇ VE YÖNTEM	88
3.1. Gereç	88
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	88
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	91
3.1.3. Hücre Dizileri	92
3.2. Yöntem	92
3.2.1. Şeftali Yağının Eldesi ve karakterizasyonu	92
3.2.2. Formülasyon Çalışmaları	92
3.2.2.1. Deneyde Kullanılan Formülasyonların Belirlenmesi	92
3.2.2.1.1. Deneyde Kullanılan Kold Krem Formülasyonu	93
3.2.2.1.1.1. % 0-6 Şeftali Çekirdeği Yağı İçeren Kold Krem	93
Formülasyonlarının Hazırlanması	
3.2.2.1.2. Deneyde Kullanılan Hidrofilik Krem Formülasyonu	94
3.2.2.1.2.1. % 0-6 Şeftali çekirdeği Yağı İçeren Hidrofilik Krem	95
Formülasyonlarının Hazırlanması	
3.2.2. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar	95
3.2.2.1. Kremlerin Dolularının Yapılacağı Kavanozların Sterilizasyonu Ve	95
Kremlerin Dolularının Yapılması	
3.2.2.2. Formülasyonlarda Stabilite Çalışması	95

3.2.2.3. Formülasyonlarda Mikrobiyolojik Stabilité Çalışması	96
3.2.2.4. Kremlerde Yapılan Fiziksel İncelemeler	97
3.2.2.4.1. Kremlerin pH'sının Ölçülmesi	97
3.2.2.4.2. Kremlerin Viskozitesinin Ölçülmesi	98
3.2.2.4.3. Kremlerin Emülsiyon Tipinin Belirlenmesi	98
3.2.2.5. Kremlerin Etkinlik ve Güvenlik Testleri	98
3.2.2.5.1. Krem Uygulama Talimatı Formu	99
3.2.2.5.2. Krem Uygulama Çalışması	100
3.2.2.5.3. Sübjektif Değerlendirme	100
3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	100
3.2.3.1. Hücre Kültürü için Sterilizasyon	100
3.2.3.2. Hücre Kültürüne Uygulanacak Anti-aging Kremler için Yapılan	100
Önişlemler	
3.2.3.3. Hücre Dizileri ve Kültür Aşaması	101
3.2.3.4. Hücrelerin Deney için Hazırlanması	101
3.2.3.5. Hücre Canlılığının Tespiti	102
3.2.3.6. Hücre Homojenizatının Hazırlanması	102
3.2.3.7. Hücre Kültüründe Biyokimyasal Ölçümler	103
3.2.3.7.1. Protein Ölçümü (Lowry Metodu)	103
3.2.3.7.2. Katalaz aktivitesini ölçümü	104
3.2.3.7.3. SOD aktivitesinin ölçümü	104
3.2.3.7.4. PON ve ARE aktivitelerinin ölçümü	104
3.2.3.7.5. MDA düzeyinin ölçümü	105
3.2.4. İstatistiksel yöntem	105
4. BULGULAR	106
4.1. Şeftali Yağının Karakterizasyonu	106
4.2. Kremlerin Hazırlanması	108
4.2.1. Kremlerin Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi	108
4.2.1.1. Kremlerin pH Değerlerinin Ölçümü	108
4.2.1.2. Kremlerin Ölçülen Viskozite Değerleri	109

4.3. Kremlerin Emülsiyon Tiplerinin İncelenmesi	110
4.4. Formülasyonlarda Mikrobiyolojik Stabilitate Sonuçları	110
4.5. Sebum Değerlerinin Ölçümüne Ait Bulgular	111
4.6. Güvenlik Testlerine Ait Bulgular	112
4.7. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular	112
4.7.1. Fibroblast Hücrelerinde Sağkalım Oranları	112
4.7.2. Fibroblast Hücrelerinde Katalaz Aktiviteleri	115
4.7.3. Fibroblast Hücrelerinde SOD Aktiviteleri	116
4.7.4. Fibroblast Hücrelerinde MDA Düzeyleri	116
5. TARTIŞMA	118
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	129
7. KAYNAKLAR	131

Şeftali Çekirdeği Yağı İçeren Kremlerin Deri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Şeftali çekirdeği yağı A, B ve E vitaminleri ile temel yağ asitleri olan oleik ve linoleik yağlar bakımından zengin içeriğe sahiptir. Hafif ama zengin içerikli bununla birlikte ince dokulu bir yağ olan şeftali çekirdeği yağı, cilde kolay nüfuz ederek besleyicidir ve tüm cilt tipleri için uygun bir yumuşatıcı özelliğine sahiptir. Rejenerasyonu ve dehidratasyonu önleyip elastikiyet ve esneklik teşvik ederek harika bir nemlendirme özelliğine sahip olduğu için pek çok kozmetik ve dermakozmetik formülasyonlarda tercih edilmektedir. Bu çalışmamızda, cold krem ve hidrofilik merhem bazlı sıvağlardan yararlanılarak hazırlanan ve farklı konsantrasyonlarda (% 0,5-6 a/a) şeftali çekirdeği yağı içeren çeşitli formülasyonların; cilt üzerindeki yağlandırma etkileri incelenerek, yaşlanma karşıtı ürün olarak kullanılabilirliği test edilmiştir. Bununla birlikte, hazırlanan formülasyonlar muhafaza koşullarının belirlenmesi açısından +4 ve 30 °C'da 6 ay stabilite testlerine tabi tutulmuştur. Ayrıca, şeftali çekirdeği yağı içeren cold krem ve hidrofilik merhem bazlı sıvağlara pH, viskozite ve mikrobiyolojik kontaminasyon testleri de yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonlar üzerinde yapılan testler sonucunda tüm formülasyonların; pH'sının 5,5-7.5 arasında, viskozluğun ise; 60000-70000 cps olduğu ve mikrobiyolojik açıdan kullanıma uygun oldukları tespit edilmiştir. Mikrobiyolojik testler sonucunda hiçbir formülasyonda herhangi bir kontaminasyona rastlanmamıştır. Formülasyonların fibroblast hücrelerinde antioksidan etkileri incelenerek, yaşlanma karşıtı ürün olarak kullanılabilirliği belirlenmiştir. Sağlıklı gönüllülerde yapılan kısa süreli testler neticesinde; formülasyonların iritan etki göstermediği, özellikle kuru ciltlerde yağlanmayı arttırarak kırıxıklıkların oluşmasını önleyici etkisi olduğu tespit edilmiştir. Kısaca özetleyecek olursak, şeftali çekirdeği yağı, yaşlanma karşıtı (anti-aging) krem formülasyonlarında etkin ve güvenli bir biçimde kullanılabilir bir hammaddedir.

Investigations About The Cosmetic Effects Of Peach Kernel Oil Bearing Creams On Skin

Peach kernel oil has rich content of A, B and E vitamins as well as some basic fatty acids like oleic and linoleic acids. It is a light, contentful, ultra structured easily penetrating nutritious oil that has softening function suitable for all skin types. It's been preferred in numerous cosmetic and dermacosmetic formulations due to its great moisturizing and elastizing characteristics by preventing the regeneration and dehydration of skin. In this study, the effectiveness of this oil in anti-aging formulations was determined by investigating the fattening effects of various cosmetics formulations (e.g. cold cream and hydrophylic balm) prepared incorporating peach kernel oil at different concentrations (0.5-6% w/w). In addition, the prepared formulations were subjected to stability studies at +4 and 30°C for 6 months to determine the storage conditions. The change in pH and viscosity was tested. Moreover, microbiological stability was carried out. As a result, pH values of formulations were determined in the range of 5.5 – 6.5 whereas viscosity values were found to be between 60000-70000 cps. They were microbiologically suitable to be used as cosmetics products since no microbiological contamination was determined. Oxidative stress is important with respect to aging of skin. Thus, antioxidant effect of the formulations were tested on skin fibroblast cell lines, indicating the effectiveness of the products as well as peach kernel oil for antiaging purposes. As result of in vivo short time effectiveness tests conducted on healthy volunteers, it was determined that they cause no irritation and may possess antiaging effect by enhancing level of oil in particularly dried skin. In short, it can be stated that peach kernel oil can be safely used in antiaging cream formulations as an active ingredient with high potential of antiaging effect.

1. GİRİŞ

Şeftali çekirdeği yağı, (*persica prunus*) isminden de anlaşılacağı gibi, şeftali meyvesinin çekirdeklerinden elde edilir. Kayısı çekirdeği yağı ile ağırlık ve görünüm olarak benzer özellikler gösterir (1).

Şeftali çekirdeği yağı *Persica Prunus* olarak da bilinen bitkinin çekirdeklerinin ayıklanmasından oluşturulur Bu yağ, sağlık üzerine yararlı etkilerinin fazla olmasıyla ünlü, hemen hemen kokusuz, yağlı ve hafif bir yağdır. Bu açık sarı rengindeki yağ soğuk presleme ve Expeller presleme gibi çeşitli yöntemlerle elde edilir Bu yöntemlerin bir diğeri ise; kimyasal çözücü ve alkol kullanılmadan mevcut ekstraksiyon yöntemlerinden en ileri olan süperkritik karbondioksit (CO₂) yöntemidir. Bu sonucusu ile elde edilen şeftali yağı, yüksek saflığa sahiptir. Bu çalışmada, süperkritik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş 100% saflıktaki şeftali çekirdeği yağı kullanılmıştır.

Şeftali çekirdeklerinin bazı türlerinde badem; hidrojen siyanür düzeyi yüksek, karakteristik lezzet veren bir zehir içerebilir. Bu toksin, kolaylıkla onun acı tadı ile tespit edilir. Ancak, miktar olarak zehir etkisi gösteremeyecek kadar az düzeydedir. Bununla birlikte; şeftali çekirdeği yağı, başta cildin sağlığını destekleyici etki olmak üzere pek çok faydaya sahiptir (2).

Şeftali çekirdeği yağı kayısı çekirdeği yağına benzerlik gösterir. Bu yağ, olgun ve hassas ciltler için çok iyidir ve derinin alt katmanlarına çok iyi penetre olur. Şeftali çekirdeği yağı, hafif kremler ve losyonlarda, masaj yağlarında kullanılır. Kolayca emildiği ve yağlı his bırakmadığı için dudak balsamı yapımında büyük bir öneme sahiptir Şeftali çekirdeği yağı da tatlı badem veya üzüm çekirdeği yağı için yedek olarak kullanılabilir (3).

Şeftali çekirdeklerinde yapılan bazı çalışmalarda 54.5% yağ ve 27.5% protein içerdiği ortaya koyulmuş ancak kül ve karbonhidrat değeri oldukça düşük olduğu bildirilmiştir. Bu

lipidlerin 98%'i trigliserid, 0.41%'i sterol ve 1.1%'i polar lipidler olduğu açığa çıkarılmıştır. Yağ asitleri içerik bakımından ortalama değer verecek olursak 50-60% arasında linoleik asit, 20-30% arasında oleik asit içerdđi ve 10-25% arasında doymuş yağ asidi içerdđi saptanmıştır. Şefali çekirdeği tozu iyi yağ emme ve emülsiyonlaştırıcı özellik göstermiş fakat su emme ve köpürme özelliklerinin oldukça düşük olduğu da çeşitli çalışmalarla ispatlanmıştır (4).

Yapılan çalışmalarla da ortaya koyulduğu gibi, linoleik asit ve oleik asit gibi doymamış yağ asitleri bakımından zengindir ve içerisinde bulunan A, B ve E vitaminleri sayesinde oldukça besleyicidir.(5). Bu nedenden dolayı bu yağ yüz için hazırlanan bazı formülasyonlarına, jellere ve çeşitli masaj yağlarının formülasyonlarına girmeye başlamıştır.

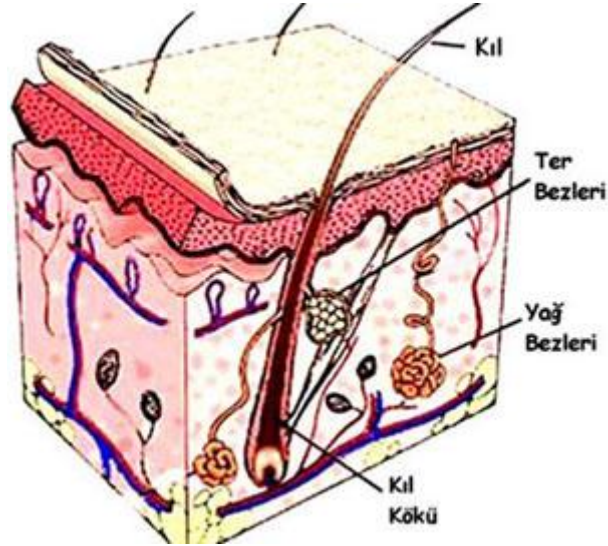
Biz de bu sebeplardan dolayı % 0.5, 1, 2, 4, 6 a/a oranlarında şeftali çekirdeği yağı içeren ve hiç içermeyen hem cold krem hem de hidrofilik merhem bazlı sıvağlardan yararlanarak formülasyon hazırladık. Hazırlanan bu formülasyonların kırk denek üzerinde yağlandırma etkilerini inceledik. Bu şekilde şeftali çekirdeği yağının yağlandırıcı ve besleyici özelliğini bir kez daha ispatladık.

Son olarak da hazırladığımız bu formülasyonları stabilite testlerine tabi tuttuk ve formülasyonların hiçbirinde stabilizasyon sorunu yaşamadık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

İnsan derisi, vücudun en büyük organıdır ve yaşam için vazgeçilmez önemi vardır.(6). Deri, vücudu dış çevreden koruyan bir kılıf oluşturur ve altındaki dokuların su kaybını önler. Deri vücut hareketi sonucunda kalıcı kıvrımlar oluşturmayacak kadar esnek ancak uyarıları algılayabilecek kadar incedir. Derinin aynı zamanda sentez, metabolizma ve vücut sıcaklık kontrolünü sağlayan ter salgısının üretimi ve terleme yoluyla atık ürünlerin atılımı gibi ek görevleri de vardır. Bunlardan başka deri, vücudu antijenik uyarılardan da korur, derinin immün sistemin bir parçası olarak da çalışan bu bölümüne *skin associated lymphoid tissue* (SALT, derideki lenfoid doku) denir.



Şekil 2.1. Derinin yapısı.(7).

İnsanda deri , kıllanmanın azlığına , ırka, kişiye, mevsime, bedenin çeşitli bölgelerine , yaşa göre değişen bir renklenme ile özelleşir .Bu değişiklikler bazı boya maddelerinin varlığına ve az yada çok yoğun olabilen damarlanmaya bağlıdır .Deri bedeni bütünüyle sarar .Ağız burun anüs V .b . doğal delikler düzeyinde, yapısı deriye benzeyen , ama daha ince olan ve mukozaya adı verilen bir örtüyle birleşir .Öte yandan kalınlığı da farklılık gösterir .Göz kapaklarında ve el sırtında çok ince buna karşılık el ayası,ve ayak tabanında çok kalındır . Sürtünmeye açık olan bölgelerde nasır adı verilen boynuzlu kalınlaşmalar görülür . Deri örtüsünün,kasların kasılmalarına bağlı kas kıvrımları, eklem hareketlerine bağlı eklem kıvrımları gibi derin katmanları, el ayaklarında ve tabanında olduğu gibi yüzeysel karışıklıkları yada çizgileri vardır . Ayrıca deride birçok delik vardır . Bu delikler kıl ve saçların geçmesine olanak verir . Deri derialtı denilen bağdokusundan oluşmuş derin bir tabaka sayesinde, kaslardan ve ak örtülerden oluşan alt düzlemlere de kayabilir . Derialtı,yağ bakımından zengin, gevşek ve esnek bir dokudur; kişiye ve bedenin çeşitli bölgelerine göre değişiklik gösteren yağ dokusunu oluşturur . Ayak tabanında ve el ayasındaysa, tel doku yumacıkları halinde, az hareketli ve çok dirençlidir . Bazı bölgelerde, deriyi kasmaya yarayan ince bir kas tabakası içerir .(6).

2.2. Derinin Embriyolojisi:

1- Ektodermden: Epidermis, kıl follikülleri, sebace bezler, apokrin ve ekrin ter bezleri, tırnaklar

2- Mezodermden: Langerhans hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri, fibrositler, kan ve lenf damarları, erekteör pili kası, platisma, yağ dokusu

3- Nöroektodermden: Melanositler ve Merkel hücreleri köken almaktadır.(6).

2.3. Derinin Histololisi:

- Epidermis-hücre içeriği zengin
- DermoepidermalBileşke

- Dermis-bağdokusu elemanlarından oluşan
- Subkutis-yağıçeriği yüksek olan (6).

2.4. Derinin Tabakaları:

Deri vücuttaki organlar içerisinde hem ağırlık, hem de hacim bakımından en büyüğüdür. Ağırlığı, yetişkin bir kişide ortalama 15-20 kg'a (vücut ağırlığının %20'si) kadar ulaşır, yüz ölçümü ise 1.80-2 m² arasında değişir.

Deri her yerde aynı kalınlıkta değildir. Genel olarak kalınlığı 0.5-2 mm arasında değişiklik gösterir. El içi ve ayak tabanında bu kalınlık 4-6 mm'ye kadar çıkar, göz kapaklarında ise 0.1 mm'ye kadar incelik.

2.4.1. Deri histolojik olarak üç tabakadan oluşmuştur:

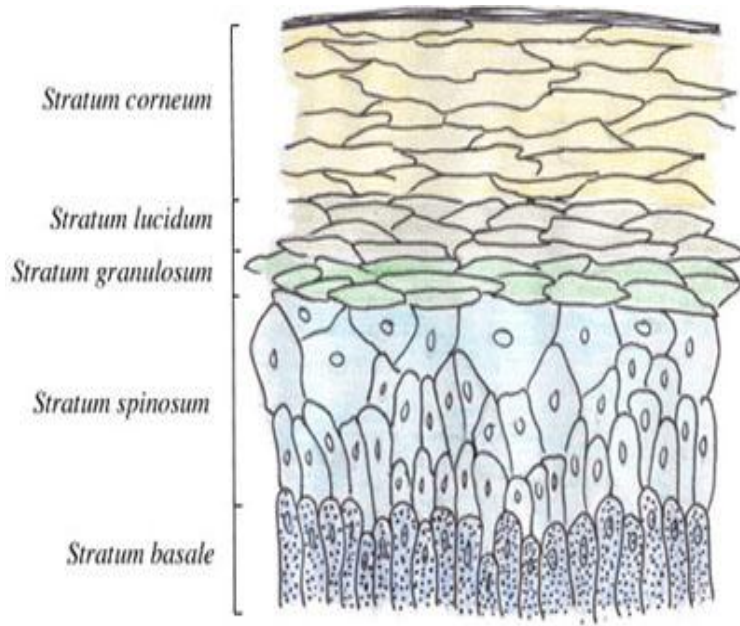
- 1- Epidermis
- 2- Dermis (Kutis-Korium)
- 3- Hipodermis (Subkutis, subkutan tabaka, pannikülüs).(8).

2.4.1.1. Epidermis:

Derinin en üst tabakası olup ve aşağıdan yukarıya doğru 5 kattan meydana gelmiştir:

- 1- Bazal tabaka (Stratum bazale)

- 2- Spinozum (Malpighi) tabakası (St. spinozum)
- 3- Granüler tabaka (St. granülozum)
- 4- Lusidum tabakası (St. lucidum)
- 5- Korneum tabakası (St. korneum)'dan ibarettir.(8).



Şekil 2.2. Epiderminin tabakaları dikey kesitten görünüşü.(9).

2.4.1.1.1. Bazal (germinatif) tabaka (St. bazale)

Epiderminin en alt tabakası olup “doğurucu tabaka” da denir. Tek sıra halindeki silindirik hücrelerden meydana gelmiştir. Bu tabakada üç tip hücre vardır; *keratinositler*, *melanositler* ve *Merkel hücreleri*.(10).

Keratinositler derinin bir nevi “Stem cell” hücreleri olarak kabul edilmektedir. Çoğalarak ve değişikliğe (diferansiyasyon) uğrayarak üst katları oluştururlar. Esas görevleri **keratin** denen fibriler proteinleri sentezlemektir. Bazal hücreler hemidezmozomlarla bazal membrana, dezmozomlarla diğer keratinositlere bağlanmışlardır. Keratinositler, immün cevap gelişiminde de, bazı sitokin ve inflamatuvar mediatörleri salgılayarak rol alırlar. Epidermal hücrelerin %90-95’i keratinositlerden oluşur.(10).

Melanositler, melanin pigmentini sentezlemekle görevlidirler ve keratinositler arasında yerleşmişlerdir. Bazal tabaka hücrelerinin 4-10’da biri melanositlerden oluşmaktadır (epidermal hücrelerin yaklaşık olarak %3-5’i). Hematoksilin-eozin (H.E) ile sitoplazmaları açık renkte görülür (clear cell). Bu hücrelerin dendritik uzantıları vardır. Bu uzantılar vasıtasıyla hücrede sentez edilen melanin, melanozom denen melanin paketleri halinde keratinositlerin üst bölümlerine taşınır. Bir melanosit 30-40 keratinositi melanize eder, bu sisteme **epidermal melanin ünitesi** denir.

Merkel hücreleri, nöroendokrin ve duyuşal fonksiyonlu hücreler olup bazal tabakada yer alırlar (palmo plantar bölge, oral-genital mukoza, tırnak yatağı, foliküller) ve epidermal hücrelerin yaklaşık olarak %1’ini oluştururlar.(10).

2.4.1.1.2. Spinozum (Malpighi) tabakası (St. spinozum):

Bazal tabakanın üstünde yer alan 5-7 sıra, çok köşeli (poligonal) hücreler topluluğundan oluşur. Hücreler birbirlerine sitoplazmik dikensi çıkıntılarla (**dezmozom**) bağlanmışlardır. Keratin sentezinin bir aşaması olan **tonofilament** sentezi bu hücrelerde yapılmaktadır. Bu tabakanın üst kısımlarında keratinin ön maddesi olan **filagrin** içeren **keratohiyalin** granülleri ve lipid içeren **Odland** cisimcikleri görülür. Hücreler arasında lenf sıvısına benzer intersellüler bir sıvı bulunur. Epiderminin beslenmesinin bu sıvı yoluyla olduğu zannedilmektedir.(10).

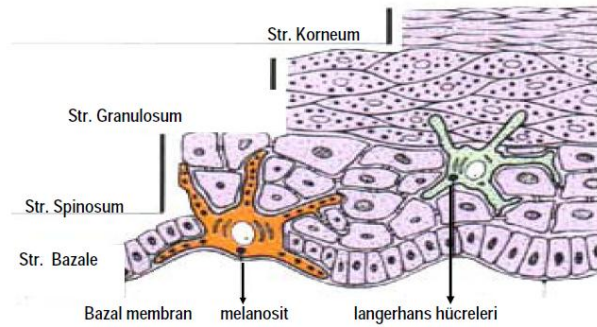
Bu tabakada immünojik fonksiyona ve antijen sunma yeteneğine sahip **Langerhans hücreleri (APC)** de yer alır ve epidermal hücrelerin yaklaşık olarak %3-5'ini oluştururlar.

2.4.1.1.3. Granüler tabaka (St. granülozum):

Bu tabaka 1-3 sıra halinde dizilmiş yassı hücrelerden ibarettir. Hücrelerin çekirdekleri kısmen atrofik ve sitoplazmalarında **keratohiyalin** granülleri mevcuttur. Mukozalarda bu tabaka görülmez. Lökoplazi gibi keratinizasyonun arttığı durumlarda St. korneum ile birlikte bulunur.(10).

2.4.1.1.4. Lusidum tabakası (St. lusidum):

Yalnız el içi ve ayak tabanında görülen bir tabakadır. Normal tabakalardan daha açık renkte görülür. Bu tabakadaki hücreler iğ şeklinde yassılaştırmış atrofik çekirdeğe sahip hücrelerdir. Sitoplazmalarında **eleidin** bulunur.(11).



Şekil 2.3. Lusidum tabakası.(6).

2.4.1.1.5. Korneum tabakası (St. korneum):

Boynuzsu tabaka da denir. Derinin en üst katıdır. Çekirdeksiz lameller halindeki hücrelerden ibarettir. Hücreler arası bağlar gevşemiştir, bu yüzden dökülme özelliğine sahiptir. Bu hücreler bol miktarda **keratin** ihtiva ederler.

St. bazale'deki keratinositler mitotik aktiviteye ve diferansiyasyon özelliğine sahiptirler. Bazal tabakadaki hücrelerin yaklaşık yarısı mitoz halindedir. Bir hücrenin bölünmesi için geçen süre (intermitotik süre) "hücre siklusu" olarak bilinir ve yaklaşık olarak 50 saattir. Bazal tabakadan doğan hücrelerin St. korneum'u oluşturup dökülmesi ile deri devamlı yenilenme gösterir. Bazal tabakada mitoz sonrası oluşan bir keratinosit yaklaşık 14 günde korneuma ulaşır ve 14 günde de deskuame olur. Bu zamana derinin yenilenme zamanı (**turn over**) denir. Bazı deri hastalıklarında bu zaman çok kısalmış, psöriazis'te olduğu gibi 3-5 güne iner.(8).

2.4.1.2. Dermis (Kutis-Korium):

Epiderminin altında bulunan, derinin kıvam ve elastikiyetini temin eden tabakadır. Esas yapıyı substansiya fundamentalis (**ground substance**) denilen jelatinöz bir madde oluşturur. Bu madde fibroblastlar tarafından salgılanır. Hiyalüronik asit, kondroitin sülfat, heparan sülfat, dermatan sülfat ve diğer mukopolisakkaritlerden meydana gelir, çok yüksek oranda su tutma kapasitesine sahiptir. Bu yapı içerisinde kollajen, elastik, retiküler lifler ve değişik hücreler dağılım gösterir. Vücudun yapısal proteini kollajendir, tendonlarda, ligamentlerde ve derimde bulunur. Derinin kuru ağırlığının %70'i kollajenden oluşmuştur.

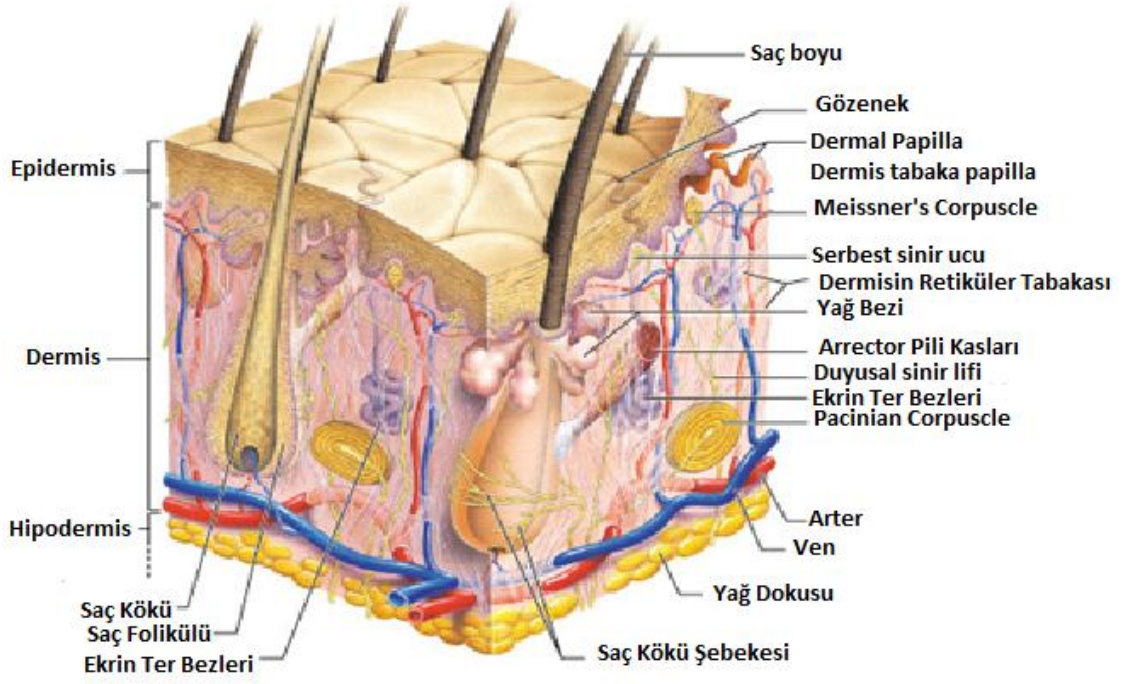
Dermiste kan ve lenf damarları, yağ ve ter bezleri, kıl follikülleri, deri kasları ve çeşitli duyu alan sinirler bulunur.

Dermis ile epidermis birbirleriyle girintili çıkıntılı bir şekilde birleşmiştir. Epidermis dermis içerisine el parmağı şeklinde girerken (**rete ridge**), dermis de epidermise aynı görünümde ilerler (**papilla**). Bu iki katın birleşim yerinde bazal membran denilen bir bölge mevcuttur. Bu bölge normal H.E boyaları ile görülmez, ancak P.A.S boyaları ile görülebilir. Bu yapı epidermisin beslenmesini ve iki tabakanın sıkı bir şekilde yapışmasını sağlar.

Dermis **papiller** ve **retiküler** kat olmak üzere iki tabakadan oluşmuştur. Papiller tabakada kapiller damarlar ve duyu alan sinir lifleri bulunur. Bu katta konnektif lifler deri yüzeyine dik olarak seyrederek. Retiküler kat dermisin alt kısmına verilen isimdir. Bu bölgede konnektif lifler deri yüzeyine paralel seyir gösterirler.(8).

Dermiste bulunan elemanlar 4 ana grupta incelenebilir:

- 1- Dermisin hücresel elemanları
- 2- Derinin damarları
- 3- Derinin sinirleri
- 4- Deri ekleri



Şekil2.4. Dermisin yapısının ayrıntılı incelenmesi.(12).

2.4.1.3. Dermisin hücresel elemanları:

Bu hücreler **mezodermal** kökenli olup 3 gruptan ibarettir:

- a- Retikülöhistiyoitik grup
- b- Miyeloid grup
- c- Lenfoid grup

2.4.1.3.1. Retikülohistiyositik hücreler:

Fibroblastlar, histiositler ve mast hücreleri.(13).

2.4.1.3.1.1. Fibroblastlar:

Ground substans ve diğer konnektif doku elemanlarını sentezler ve yıkarlar.

2.4.1.3.1.2. Histiyositler:

Dermiste az miktarda perivasküler olarak bulunan makrofajlardır. Patolojik durumlarda dermise göç ederler ve özellikle fagositozda rol oynarlar. Bu hücreler aynı zamanda epiteloid hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptirler.(14).

2.4.1.3. 1.3. Mast hücreleri:

Sitoplazmalarında bazofilik granüller ihtiva ederler. Bu granüllerden histamin ve benzer etkiye sahip bazı mediatörler salgılanır. Normalde sayıları çok azdır. Ürtikerya pigmentoza ve atopik dermatit gibi bazı dermatozlarda bu hücrelerde artma görülür.

2.4.1.3.2. Myeloid hücreler:

Polimorfonükleer lökositler (PNL) ve eozinofiller. PNL'ler iltihabi olaylarda, eozinofiller ise allerjik dermatozlarda dermiste kümelenirler.

2.4.1.3.3. Lenfoid hücreler:

Derinin inflamatuvar olaylarında ve neoplastik hastalıklarında dermiste bol miktarda görülürler. Dermatolojide özellikle T lenfositler önemlidir.

2.4.1.4. Derinin damarları:

2.4.1.4.1. Derinin kan damarları:

Subkutan tabakadan gelen arterler subkutis-kutis sınırında geniş bir damar ağı yaparlar (derin pleksus). Buradan çıkan yan dallar deri eklerine ulaşarak bunların beslenmesini sağlarlar. Dermis içerisinde ilerleyen esas ana kollar, papiller katta daha ince bir pleksus ağı meydana getirirler (yüzeysel pleksus). Bu son pleksustan çıkan arterioller, papiller kat içerisinde terminal kapillerler halinde son bulurlar. Terminal kapillerler venöz kapillerlere dönüşür, venöz kanı toplayan venüller, arterlerle paralel şekilde geriye dönerler.(15).

2.4.1.4.2. Lenf damarları:

Derinin lenf sistemi St. spinozum'daki hücreler arası boşluktan başlar. Papiller katta ilk lenf kapillerleri teşekkül eder, daha büyük damarlara dönüşür ve subkutan tabaka altında genel lenf sistemine ulaşır. Lenf damarları, kan damarları ile paralel şekilde uzanır. (15)

2.4.1.5. Derinin sinirleri:

Deri, yüzeyi ile orantılı şekilde geniş bir sinir ağına sahiptir. Deride duyu ve motor sinirleri olmak üzere iki cins sinir mevcuttur.

2.4.1.5.1. Duyu sinirleri:

Duyu sinirleri miyelinli olup serebrospinal sinirlerdir. Bu sinirler dermisin papiller katına kadar uzanırlar. Bu sinirlerin bir kısmı miyelinlerini kaybederek serbest sinir uçları halinde epidermisin üst katlarına kadar ulaşırırlar. Dermis içerisindeki sonlanmalarda ise çeşitli özel duyu alan cisimcikleri veya korpüskülleri oluştururlar (Paccini, Meisner...) Bu sinirler yardımıyla dokunma, ısı, ağrı, kaşıntı gibi duyu alınırlar. (15)

2.4.1.5.2. Motor sinirler:

Motor sinirler ise miyelinsiz olup otonom sinir sistemi kontrolü altındadır. Bu sinirler kan damarlarını, musculus errektör pili'yi, ekrin ve apokrin ter bezlerini inerve etmektedir. Yağ bezleri otonom sinir sisteminin kontrolü altında olmayıp fonksiyonlarını hormonal stimuluslarla ayarlarlar. (15)

2.4.1.6. Keratinize deri ekleri:

2.4.1.6.1. Kıllar:

Kıllar insanlarda el içi, ayak tabanı, dudak kırmızısı, son falankslar ve glans penis hariç deride yaygın olarak bulunurlar. İntrauterin hayatta fetus, lanugo tüylerle kaplıdır. Doğumdan sonra “vellus” tüyleri infantın derisini örter. Pubertede androjenlerin etkisiyle pubis, aksilla, yüz ve göğüste terminal (kalın, koyu pigmente) kıllar gelişir. Deride uzun kıllar, kısa ve sert kıllar, ayva tüyleri (vellus) olmak üzere 3 cins kıl mevcuttur.

Kıl follikülü, epidermisin eldiven parmağı gibi dermis içine çökmesi ile oluşmuştur. Kılın deri üzerinde görünen kısmına **kıl gövdesi**, kıl follikülü içinde kalan kısmına ise **kıl kökü** (radiks pili) denilir. Radiksin alt kısmı soğan şeklini almıştır, buna **bulbus** denir. Bulbusun alt kısmı içeriye çökük olup buraya **papilla** ismi verilir, damar ve sinirler bu bölgeden kıla girerler. Follikülün deriye açılma ağzına **ostium** denir. Ostiumdan aşağıya inildikçe daralarak huni biçimini alan kısma **infundibulum**, infundibulum ve bulbus arasına ise **isthmus** denir.(16)

2.4.1.6.2. Tırnaklar:

El ve ayak parmakları son falankslarının dorsal yüzünde bulunan, konveks, yarı şeffaf boynuzsu yapılardır. Uçların travmaya karşı korunmasını sağlar ve ince işlerde destek görevi yapar. Tırnaklar ortalama olarak günde 0.1 mm büyüme gösterirler. Tırnağın proksimalinde,

tırnak büyümesini sağlayan **matriks** bulunur. Matriks, tırnak plağı altında beyaz renkte, yarım ay şeklinde görülür ve **lunula** ismi verilir. Tırnak plağının altında bulunan kısma tırnak yatağı (**hiponişyum**) denilir.(16).

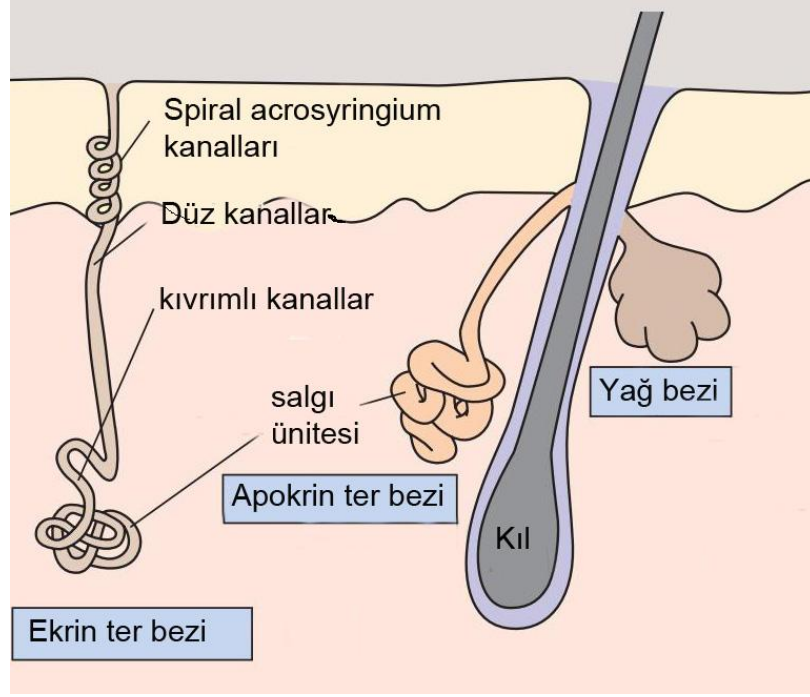
2.4.1.7. Salgı yapan deri ekleri:

2.4.1.7.1. Ter Bezleri:

2.4.1.7.1.1. Ekrin ter bezleri:

Bu bezler, deride yaygın olarak dağılmışlardır, **merokrin** türde salgı yaparlar. En çok bulunduğu yerler; el içi, ayak tabanı, alın, aksiller ve genito-anal bölgelerdir. Normal olarak glans penis, prepisyum iç yüzü, labium minörler, dudak kırmızısı gibi vücut bölgelerinde bulunmazlar. Tüm vücutta 2-5 milyon arasında ve sabit sayıda ekrin ter bezi vardır. Uyarılmaları kolinerjik sinirler aracılığı ile olur.

Bu bezlerin iki kısmı vardır. Esas salgıyı yapan kısım (glomerulus) yumak halinde dermisin derin katlarında bulunur. İkinci kısım olan boşaltım kanalı ise salgıyı deri yüzeyine götürür ve epidermis içerisinde kıvrıntılı bir yol takip eder. Bu bezler özellikle organizmanın ısı regülasyonunda rol oynarlar, bundan başka bir ön böbrek vazifesi görerek organizma için zararlı maddeleri vücuttan uzaklaştırırlar. Ekrin ter bezlerinin salgısı ve plazma içeriğine eşdeğer (izotonik) yapıya sahiptir. pH'sı 4.2-5.6 arasında değişen deri asit mantosunun oluşturulmasında büyük rol oynar. Bu sayede bir çok biyolojik etken (mikroorganizmalar) deride kolayca hastalık oluşturamaz. Asit mantosunun ortadan kalktığı hallerde (fizyolojik olarak derinin birbirine sürtünen bölgeleri ve apokrin bezlerin bulunduğu bölgeler, diabet gibi bazı metabolik hastalıklar) gerek bakteriyel ve gerekse mantar enfeksiyonları kolayca oluşur.(17).



Şekil 2.5. Apokrin ter bezleri.(18).

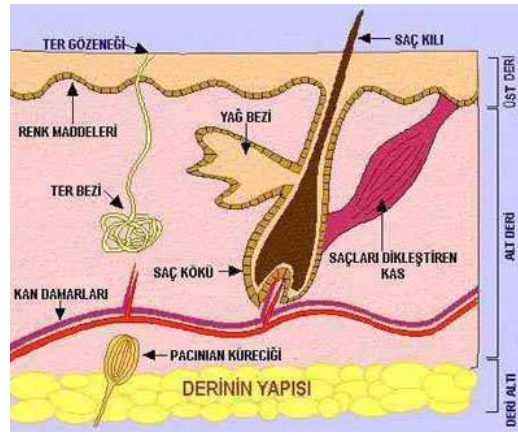
2.4.1.7.1.2. Apokrin ter bezleri:

Bu bezler; koltuk altı, meme başı, genital ve anal bölge gibi belirli yerlerde lokalize olmuşlardır, **apokrin** türde salgı yaparlar ve puberteden sonra aktif hale geçerler. Glomerul kısmı ektrin ter bezlerine göre daha büyük olup subkutan yerleşim gösterir. Boşaltım kanalı serbest olarak epidermise değil ostium folliküla'ye açılır. Bu bezlerin salgısı kokusuz olup bakteriyel yıkım sonucunda kişiye özel beden kokusu oluşur. Göz kapaklarında bulunan Moll bezleri ve dış kulak yolunda bulunan seruminöz bezler değişikliğe uğramış apokrin bezler olarak kabul edilmektedir.

Ektrin ve apokrin ter bezleri arasında bazı farklar vardır. Ektrin ter bezlerinin salgıları sulu olup, apokrin ter bezlerinin salgıları süt görünümündedir. Ektrin ter bezleri kolinerjik, apokrin ter bezleri adrenerjik sinirlerin ve özellikle androjenlerin kontrolü altındadır. Son

zamanda bu iki tip bezin ortak özelliklerine sahip **apoekrin** ter bezlerinden de söz edilmektedir.(17).

2.4.1.7.2. Yağ Bezleri:



Şekil 2.6. Yağ bezleri (19)

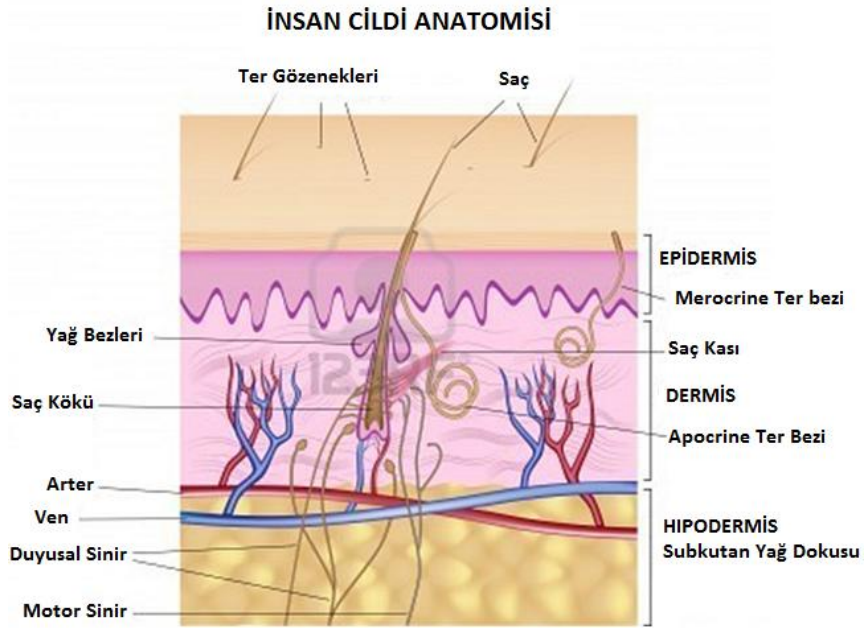
Bütün deri yüzeyinde, özellikle de seboreik bölgeler denen; saçlı deri, kulak arkası, kaşlar, sulkus nazolabialis, alın, çene, presternal, interskapüler, genital ve perianal bölgeler gibi yerlerde daha çok olmak üzere bulunurlar ve **holokrin** türde salgı yaparlar.

Yağ bezleri kıl folliküleri ile birlikte bulunurlar (pilo-sebase unit). Bu bezlerin boşaltım kanalları ostium follikülaye açılır. Salgılarına **sebum** ismi verilir. Sebum; yağ asitleri, yağ esterleri, skualen ve kollerlerinden yapılmıştır. M. erekör pilinin kasılmasıyla oluşan mekanik etki ile sebum dışarı boşaltılır. Sebese bezler el içi, ayak tabanı gibi kıl olmayan

bölgelerde bulunmazlar. Göz kapaklarında (Meibomius bezleri), bukkal mukoza ve dudağın vermilyon sınırlarında (Fordyce spots), prepisyumda (Tyson bezleri), kadınlarda areola çevresinde (Montgomery tüberküleri) de özelleşmiş yağ bezleri vardır.

2.4.1.7.3. Subkutan Tabaka (Subkutis):

Dermiste paralel seyreden bağ dokusu lifleri bu tabakada deri yüzeyine dik olarak seyir gösterirler (septa), buna bağlı olarak bu tabaka, içerisinde yağ hücre topluluklarından zengin bölmelere (lobül) ayrılmıştır. Bu yağ topluluğuna pannikülus adipozus denir. Bu tabaka damar ve sinir yönünden çok zengindir.



Şekil 2.7. İnsan cildinin anatomisi. (20)

2.4.1.8. Derinin Görevleri:

Derinin fizyolojik görevleri önemlidir. Her şeyden önce, bedeni, çarpmalara karşı koruyan dirençli ve esnek bir kılıf gibi sarar. Ayrıca, toz ve mikroplara karşı bir bağışıklık seti oluşturur. Yağ ve ter gibi salgılarda etkili koruyuculardır. Damarların kan gelişini düzenleyen genişlemeleri ve daralmaları ile terleme, beden sıcaklığının düzenlenmesinde, deriye önemli bir görev yükler. Terle, üre gibi bazı zehirli maddeleri atan deri, bazı ilaçlara ve yararlı maddelere karşı geçirgendir: Güneş ışınları sayesinde D vitamini birleşimi yapar. Deri kişi ile birlikte yaşlanır ve yaşlanma ile birlikte değişikliğe uğrar. Derinin kendine özgü bazı hastalıklarını deri bilim (dermatoloji) adı verilen dal inceler. Ama genel hastalıklar sırasında da deride, renk, yapı ve görünüm değişiklikleri gözlenebilir. Bütün deri hastalıkları çıplak gözle değerlendirilemez. Bazıları ancak büyüteçle gözlenebilir; bazıları da yalnızca elle muayeneyle saptanabilir. Bazı durumlardaysa, döküntülerin yada bir doku parçasının mikroskop altında incelenmesi (biyopsi) yada bir bakteri ekimi (kültür) sayesinde teşhis konur.

Deri, en büyük duyu organımızdır ve vücudumuzun dışını tamamen kaplar. Ayrıca vücut ısısını ayarlar, solunum ve boşaltıma yardımcı olur ve vücudu dış etkilerden korur. Ayrıca derinin üzerinde dokunmayı, basıncı, ağrıyı, sıcaklığı, soğuğu vb. duyuuları algılayan almaçlar vardır.(21).

2.4.1.8.1. Koruma Görevi:

Derinin koruma görevini deriyi iki tabakaya ayırarak inceleyecek olursak:

2.4.1.8.1.1. Üst deri:

Derinin alt bölümlerini koruyan tabakadır. Bu tabakada kan damarları ve sinirler bulunmaz. Üst derinin en dış bölümü ölü hücrelerden meydana gelmiştir. Bu bölümün altında canlı hücrelerden oluşan bir tabaka bulunur. Bu tabaka, deriyi güneşten gelen zararlı ışıklardan korur. Üst deride ayrıca derinin rengini belirleyen hücreler de vardır.(21).

2.4.1.8.1.2. Alt deri:

Üst deriye göre daha kalın olan alt deri, canlı hücrelerden oluşur. Alt deride kan damarları, kıl kasları, sinirler, ter bezleri, yağ bezleri, kıl kökleri ve duyu almaçları yer alır. Bu bölümün en altında ise yağ tabakası bulunur. Yağ tabakası vücudu çarpmalara ve vurmalara karşı korur ve vücudun ısı kaybını önler. Burada yer alan ter bezleri, terleme ile boşaltıma yardımcı olur.(21).

2.4.1.8.2. İç Etkenlere Karşı Koruma Görevi :

- Detoksifikasyon görevi
- Vücut ısısının düzenlenmesi
- Kıl-yağ bezi birimi
- Deri altı yağ tabakası
- Damarların özel yapısı
- Ter bezleri

2.4.1.8.3. Dış etkenlere karşı koruma görevi:

2.4.1.8.3.1. Biyolojik etkenlere karşı koruma

- Epidermal turn-over
- Epiderminin kompakt yapısı
- Damar ağlarından ve korumada özel görev üstlenen hücrelerden zengin olması

2.4.1.8.3.2. Fiziki etkenlere karşı koruma

2.4.1.8.3.2.1. Mekanik etkenler

- Epidermisin kompakt yapısı
- Lifler Papiller dermis→deri yüzeyine dik
- Retiküler dermis→deriye paralel
- Subkutis tabakası: koruyucu yastık
- Işık, Isı, Elektrik, Nem

2.4.1.8.3.3. Kimyasal etkenlere karşı koruma

- Lipid manto ve keratin önemli

2.4.1.8.3.4. Depo Görevi:

Karbonhidratlar, yağ, su, kan

2.4.1.8.3.5. Duyu Organı Görevi:

Dermisde epidermise kadar sokulmuş serbest sinir uçları, özelleşmiş son yapıları, duyu sinirleri ;

- ❖ Serbest sinir uçları: ağrı, kaşıntı
- ❖ Meissner cisimciği: temas
- ❖ Ruffini iğleri: sıcaklık
- ❖ Krause cisimciği: soğukluk
- ❖ Vatter-paccini: denge

2.4.1.8.3.6. Absorbsiyon ve Rezorpsiyon Görevi:

Deri metabolik olarak aktif bir organdır. Katabolize etme yeteneği vardır. Endojen kimyasal maddeler, hormonlar, steroidler ve inflamatuvar medyatörler Ksenobiyotikler, ilaçlar, peptisistler, endüstriyel ve çevresel kimyasallar Yağlar ve yağda eriyen maddeler, gazlar(civa, aseton, eter ve alkol buharları) Suda eriyen maddeler, fenol, salisilik asit, resorsin, yağda eriyen hormonlar bu yolla katabolize edilir.(21).

2.4.1.8.3.6.1. Perkutanöz absorbsiyon:

Deri katmanları boyunca ilacın aktarılmasını ifade eder.

2.4.1.8.3.6.2. Penetrasyon:

Maddenin stratum korneuma girişidir.

2.4.1.8.3.6.3. Permeasyon:

Maddenin ilk tabakadan farklı bir tabakaya geçişidir.

2.4.1.8.3.6.4. Resorpsiyon:

Maddenin vasküler sisteme aktarılmasıdır.

2.4.1.8.3.7. Perkutanöz absorbsiyonun önemi:

İlaçların deriden geçip kan dolaşımına girmeleri istenir. Deri bariyerini aşmak için hızlandırıcılar veya emilimi kolaylaştırıcı ürünler ilave edilebilir. Kozmetiklerin ise deriye

penetre olması değil deri yüzeyinde kalması istenebilir. Mesleki maruziyetlerde de kimyasalların deriden emilmesi istenmez.(21).

2.5. Deri Yaşlanması

Deri yaşlanması, derinin fonksiyon ve görüntüsünü etkileyen, sinsi ve progresif seyreden dejeneratif bir süreçtir. Deri, yaşlanmaya bağlı değişikliklerin görünür olduğu en temel organdır. İnsan derisi diğer tüm organlar gibi kronolojik olarak yaşlanır. Doğal yaşlanma kişinin genetik alt yapısının belirteçidir; zamana bağımlı kronolojik bir süreç olup kaçınılmazdır ve engellenemez. Diğer organlardan farklı olarak deri, doğrudan dış dünya ile karşı karşıyadır ve çevresel hasardan da direkt olarak etkilenir. Çevresel etkiler yaşlanmayı hızlandırır, arttırır ya da erken başlatır. Ekstresek yaşlanma, sigara, aşırı alkol kullanımı, yetersiz beslenme ve olumsuz çevresel faktörlere bağlı olarak gelişir. Deride görülen değişikliklerin %90'ından fazlası kronik güneş hasarının yol açtığı (foto yaşlanma) çevresel etkilere bağlıdır. Foto yaşlanma da kronolojik yaşlanma gibi kümülatif bir süreçtir. Foto yaşlanmanın derecesi derinin ne kadar ve ne süredir güneşe maruz kaldığına ve kişinin deri tipine bağlıdır Açık havada çalışanlar, sıcak iklimlerde yaşayanlar ve açık tenli kişiler foto yaşlanmadan daha fazla etkilenirler (47).

Deri yaşlanması oldukça kompleks bir süreçtir ve patogenezi tam olarak anlaşılammıştır. Son yıllarda kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma ile ilgili hücrenel ve moleküler mekanizmalar daha iyi anlaşılmmıştır. Bu bilgiler göstermiştir ki foto yaşlanma ve kronolojik yaşlanmada temel olaylar benzerdir. Bu yeni moleküler bilgiler anti aging tedavi yaklaşımlarında da gelişmelere ışık tutmuş (48).

2.5.1. Deri Yaşlanmasının Çeşitleri

2.5.1.1. Kronolojik Yaşlanma

Kronolojik deri yaşlanması (intrinsik yaşlanma), deride belirgin morfolojik değişikliklerden çok fonksiyonel değişiklikler ile karakterizedir. Klinik ve histolojik görüntüde belirgin bir değişiklik olmasa da derinin maksimum fonksiyon ve kapasitesinde yaşla birlikte belirgin azalma görülür. intrinsik yaşlanma ile sonuçlanan fonksiyonel azalmalar, keratinosit ve fibroblast proliferasyon ve sitokin salınım kapasitesindeki düşüşe ve çevresel uyarana hücreler arası cevabın azalmasına bağlıdır. Bunlar sırasıyla; küçük hasarların iyileşmesinde yavaşlama, cerrahi sikatrislerin dayanıksızlığı, iyileşmeyen ülserlere eğilim, ileri yaşta karakteristik olan kuru ve sıklıkla kaşıntılı deriye neden olur. Yara iyileşmesi genç erişkinde yaşlı erişkinden %50 daha hızlıdır. Ayrıca bariyer fonksiyonu azaldığı için yaşlıda su kaybı gene erişkinden çok daha kolaydır. Keratinositler bariyer oluşturma fonksiyonları dışında yüksek metabolik aktiviteye de sahiptir. Sitokin ve büyüme faktörleri salgılayarak derideki diğer hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonunu düzenler. Bu anlamda dengeyi sağlamak ve dokudaki hasarı en aza indirmek için çok sayıda çevresel uyarıya cevap verirler (60). Epidermal keratinosit kaynaklı deri eklerinde de hücre proliferasyonunda azalmanın neden olduğu, saç ve tırnaklarda incelme, yavaş büyüme, holokrin bezlerin sekresyonunda azalma gibi değişiklikler meydana gelir. Yaşlanma ile dermisteki fibroblast sayısında azalma görülür. Bu azalma 80'li yaşlarda yeni doğan döneminin yarısı kadardır. Yaşlanmış fibroblastlarda kollajen sentezindeki azalmaya ek olarak kollajenaz aktivitesi de belirgin olarak artmıştır. Sonuç olarak yaşlanmış hücreler yaşla birlikte daha proteolitik hale gelir. Reaktif oksijen radikallerinin deride oksidatif hasara neden olarak yaşlanmayı hızlandırdığı bilinmektedir. Serbest radikaller çiftleşmemiş elektron içeren oksijen moleküllerinden oluşur. Serbest radikallerin kollajen yıkımına ve elastin birikimine yol açan gen ekspresyonlarını indüklediğini gösteren deliller vardır. Antioksidanlar reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu mekanizmalardır (61).

Hayat boyunca mitokondrial DNA'da meydana gelen mutasyonların yaşlanmaya yol açtığı varsayılmaktadır. Yaşlılarda DNA tamir kapasitesi azalmıştır bu da mutasyon riskini

arttırarak deri kanserlerin oluşumuna yol açabilir. Menopoz sırasında over kaynaklı östrojenle birlikte progesteron, aynı zamanda FSH ve LH seviyelerinde artış vardır. Menopoz sonrasında çoğu kadın, derisinin inceldiğinden, kurduğundan, kırıştığından ve elastikiyetini yitirdiğinden şikâyet eder. Her ne kadar bu değişiklikler hormonal sebeplere bağlansa da östrojen eksikliğinin deri kalınlığının azalmasında ve kurumasındaki rolü ve mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Günümüzde yaşlanma ile birlikte görülen bu deri kalınlığındaki değişiklikler özellikle östrojenin kollajen sentez ve yıkımında rol aldığını düşündürmektedir. Çalışmalar oral hormon replasman tedavisinde olduğu gibi topikal östrojenin de deri kalınlığını koruduğunu ve derinin kollajen ve glikozaminoglikan içeriğini artırdığını göstermiştir (62-63).

2.5.1.2. Foto yaşlanma

Foto yaşlanma, tekrarlayan güneş hasarına bağlı deride ortaya çıkan fiziksel ve fonksiyonel değişikliklerdir. UV derinin erken yaşlanmasına sebep olur. Foto yaşlanmanın derecesi derinin ne kadar ve ne süredir güneşe maruz kaldığına ve kişinin deri tipine bağlıdır. Kronik güneş hasarına bağlı yaşlanmanın mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte son 10 yıldır foto yaşlanmanın hangi moleküler mekanizmalarla ortaya çıktığı merak konusu olmuştur. UV'nin insan derisindeki moleküler cevabı reaktif oksijen radikallerinin foto kronolojik üretimi ile başlar (64). UV hücre yüzey büyüme faktörünü ve sitokin reseptörlerini aktive eder. NADPH oksidazı aktive eder. NADPH oksidaz keratinositlerdeki UV'ye bağlı hidrojen peroksit üretiminde önemli bir enzimdir. UV'ye maruz kalma, reaktif oksijen türevleri oluşumu aracılığı ile kümülatif hasara yol açarlar. Foto yaşlanmanın görüldüğü deride gözlenen dermal değişiklikler temel olarak matris metalloproteinazları (MMP) ve MMP doku inhibitörleri (TIMMP) ile regüle edilir. MMP ve TIMMP'ler fibroblast ve makrofajlarda sentezlenir. UV'nin indüklediği MMP, kollajen tip I ve III'ün parçalanmasına yol açar ve derminin yapısal bütünlüğü bozulur Tamir mekanizmaları çalışmazsa birbirini izleyen UV dozları ile birlikte kollajen hasarı artacaktır. Bu biriken kollajen hasarı da tipik foto hasarlı deri fenotipini oluşturacaktır. Matür dermal kollajenin azalmasının yanında UV, tip I ve III prokollajen üretimini de inhibe ederek devam eden kollajen sentezini de bozar. Derideki pigmentlerin aktinik hasara karşı deriyi koruduğu iyi bilinir. Açık tenli kişiler esmer tenli kişilere göre UV'den sonra daha çok kızarıp ve daha az bronzlaşırlar. In vivo çalışmalarla

da gösterilmiş ki esmer tenli kişilerde foto hasar açık tenli kişilere göre daha az olmaktadır. Deri kanserleri de esmer tenli kişilerde daha az sıklıkta görülmektedir. Açık ve koyu tenli kişilerde DNA'nın foto ürünlerinin buldukları derinlikler de farklıdır. Açık tenli kişilerde DNA'nın ürünleri epiderminin tüm katlarında ve üst dermiste gözlenmektedir. Koyu tenli kişilerde ise bunlar üst epidermiste post mitotik hücrelerde sınırlanmışlardır. Derideki pigment yoğunluğunun yanı sıra UV dalga boyu da önemlidir Yaşlanmayla ilişkili UV etki spektrumuna tam olarak ayırt edilememiştir. Genel olarak UVB'nin daha çok epidermal hasara, UVA'nın ise dermal değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir (65-66). Derideki kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma arasındaki farklılıklar Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Derideki kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma arasındaki farklılıklar (67).

	Kronolojik yaşlanma	Foto yaşlanma
Klinik	Düzenli, lekesiz, elastiklik kaybı	Nodüller, sert, lekeli, ince ve derin kırışıklıklar
Deri çizgileri	Normal geometrik paternde	Belirgin olarak değişmiş, silinmiş
Epidermis kalınlığı	Azalmış	Erken dönemde artmış, geç dönemde atrofi
Proliferasyon hızı	Normalden azalmış	Normalden artmış
Bazal keratinosit	Sellüler düzensizlik	Heterojenite, diskeratoz
Keratinasyon	Değişmemiş	Değişmemiş
Str. Korneum	Normal, basket filesi görüntüsü	Heterojenite: basket filesi ve kompakt patern
DEB	Rete kaybı, düzleşmesi, denses reduplikasyonunda azalma	Rete kaybı, düzleşmesi, denses reduplikasyonunda artma
Dermis	Yok	Belirgin

Grenz zonu	Elastogenezi elastoliz izler (güve yeniği fibriller)	Belirgin elastogenezi masif dejenerasyon izler
Elastin	Fibrilde ılımlı birikim	Elastik fibrilde yoğun birikim
Lizozom elastik Kollajen	Fibril demeti büyüklüğünde ve organizasyonunda ılımlı değişim	Fibril demeti büyüklüğünde orta düzeyde değişim
Mikrovaskülarite	Normal yapı	Bazal membrana benzer materyal birikimi
İnflamatuvar hücre	İnflamasyon bulgusu yok	Perivenüler, histiyositik, lenfositik birikim

2.5.2. Yaşlanmış Derinin Histolojik Özellikleri

2.5.2.1. Epidermis

Yaşlanmaya bağlı görülen değişiklikler dermiste daha belirgin olmakla birlikte epidermiste de değişiklikler görülmektedir. Yaşla birlikte stratum korneumun değişmediğini gösteren çalışmaların yanı sıra yaşlanmayla epidermis kalınlığının azaldığını bildiren yayınlar da vardır. Yaşlanmış deride bazal tabaka hücrelerinin büyüklüklerinde, morfolojik görüntülerinde değişiklikler gösterilmiştir. Benzer değişiklikler aktinik yaşlanmanın bulunduğu deride daha belirgindir. Kronolojik yaşlanmada stratum korneum nispeten normal görülür (68). Ancak korneositlerin yüzey alanlarının artış gösterdiği ve bu nedenle kimyasal maddelerin atılımlarında gecikme olduğu bildirilmektedir. Dermoepidermal bileşkenin (DEB) girintili çıkıntılı olması deriyi mekanik etkilerden korur. Histolojik olarak deri yaşlanmasında Dermoepidermal bileşkede düzleşme ve dermal papillalar ile epidermal rete çizgilerinde silinmeye bağlı olarak iki bölge arasında kalan yüzey alanında azalma olur. DEB'deki bu alan kaybı da deri frajilitesinde ve dermis ile epidermis arasındaki besin geçişinde azalmaya sebep olur. Melanin üretimi klasik olarak UV ışığından sonra artar. Melanin karsinojenik UV

ışınlarını absorbe eder. Yirmi beş-otuz yaşından sonra her 10 yılda bir dopa-pozitif melanositlerde %20 azalma görülür. Yaşlanmış deride melanositler daha büyük ve morfolojik olarak daha heterojendir. Melanositlerin yaşla birlikte azalmasına bağlı olarak yaşlılar, UV'nin yol açtığı epidermal DNA hasarına karşı daha hassastırlar (69).

Dendritik hücreler doğal ve edinilmiş immün sistem arasında köprü görevi görürler. Antijenin alınması, işlenmesi ve T hücrelerine sunulmasında görevlidir. Derideki dendritik hücreler Langerhans hücreleri olarak bilinir. Yaşla birlikte Langerhans hücrelerinin hem sayısı hem de ultraviyoleye karşı verdikleri yanıt azalır. T hücrelerinin sayısı ve sitokin üretme kapasiteleri de azalmaktadır. Langerhans hücre yoğunluğu güneş gören alanlarda UV'den korunmuş, deri alanlarının yarısı kadardır. Bu durum yaşın ilerlemesiyle UV ile ilişkili deri hastalıkları özellikle de deri kanseri gelişmesine yardım eder (70).

2.5.2.2. Dermis

Deri yaşlandıkça dermis kalınlığı azalır. Dermiste yaşlanma ile ilgili en dikkat çekici değişiklikler kollajen, elastin ve glikozaminoglikanlarda görülür. Yaşlanmış deride kollajen fibrilleri kalınlaşmış ve halat benzeri demetler halinde dizilmişlerdir. Histolojik olarak kronik güneş hasarına bağlı yaşlanmış deri olgun dermal kollajenin kaybı ve kollajende farklı bir bazofilik görünüm (bazofilik dejenerasyon) ile karakterizedir. Genç deride %80 tip I, %15 tip III kollajen bulunurken yaşla birlikte tip I kollajen azalır. UV'ye maruz kalmış deride de tip I kollajen azalır. Bu azalmanın derecesi foto hasarın şiddetiyle uyum gösterir. Tip IV kollajen dermoepidermal bileşkedeki temel kollajen olup mekanik etkileşim için büyük önem taşımaktadır. Kırışıklık bölgelerinde bu kollajende azalma tespit edilmiştir. Dermoepidermal bileşkenin stabilizasyonunu sağlayan tip VII kollajen içeren anchoring fibriller azalmış ve buna bağlı olarak da foto-hasarlanmış derinin mekanik hasarlara karşı hassas olabileceği düşünülmüştür (70).

Yaşlanma ile dermiste kollajen liflerinde düzensizleşme ile anormal elastin içeren madde birikimi görülmektedir. İntrinsik yaşlanma elastin lif yapısının 30'lu yaşlarda başlayıp

70'li yaşlarda derinleşen progresif destrüksiyonudur. Foto-yaşlanmanın histolojik temel bulgusu ise solar elastoz olarak adlandırılan, dermisin üst ve orta tabakalarında yoğun elastotik madde birikimidir. Bu solar elastotik materyal elastin, fibrillin ve diğer ekstrasellüler matriks komponentlerinden oluşur. Glikozaminoglikanlar kendi hacimlerinin 1000 katı kadar suyu bağlayabilme özellikleri olan moleküllerdir. Yaşın ilerlemesi ile birlikte dermisteki glikozaminoglikanlarda, özellikle hiyaluronik asitte azalma görülür. Ayrıca proteoglikan kaybına bağlı olarak kollajen lifler daha kompakt hale gelir.

Yaşla birlikte papiller dermis vaskülaritesinde azalma görülür. Dermal damarlanmanın azalması deride solukluğa ve ısının azalmasına yol açar ve dermal damarlardaki destek dokusunun progresif kaybı yaşla birlikte ekimozların artışına yol açar. Ayrıca bazal membrana benzer maddenin perivasküler birikim sonucunda duvar yapısında meydana gelen değişiklikler vasküler frajilitede artışa yol açar, dermal vasküler yatakta oluşan değişiklikler sonucunda termoregülayonda yetersizlik olur (71).

2.6. Anti-aging Tedavi Yöntemleri

Yaşlanma ve bunun ortaya çıkardığı sorunların giderilmesi, insanlarda çok fazla merak uyandırmaya başlamıştır. İnsanlar genç görünümü mümkün olduğunca uzun süre devam ettirmek amacı ile birçok alanda tedavi arayışı içine girmektedirler. Hem yaşlı nüfusun giderek artması, hem de kadınların ve erkeklerin kozmetik konulara olan yaklaşımlarındaki değişiklikler nedeni ile dermatologlara bu konuda başvuran hasta sayısı giderek artmaktadır. Son yıllarda kullanılan farklı yöntemlerle, invaziv cerrahi girişimlere gerek kalmadan yaşlanmanın etkilerinin geciktirilmesi mümkün olmaktadır. Deri yaşlanmasında farklı faktörlere bağlı olarak farklı klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Optimal sonucu elde etmek için hastaları dermatologlar tarafından dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi, güvenli ve etkili kozmetik girişimin seçilmesi ve uygulanması gerekmektedir (72).

2.6.1. Farmakolojik Ajanlar

2.6.1.1. Güneşten koruyucular

Ultraviyole (UV) ışınları ekzojen yaşlanmanın, düzensiz pigmentasyonun ve kırışıklıkların en önemli nedenidir. Güneşten koruyucular ilk çıktıklarında daha çok güneş ışınlarına bağlı eritem oluşumunu engelleyici etkileri üzerinde durulmaktaydı ama son zamanlarda foto-yaşlanma ve deri kanseri gibi UV ışınlarının uzun dönemdeki etkilerini önleyici etkileri de gündeme gelmiştir. Boyd ve arkadaşları Amerikan aktinik keratoz çalışması süresince düzenli olarak güneşten koruyucu kullananlarda dermal elastozisde belirgin azalma olduğunu bildirmişlerdir. Kısa dönem yapılan bir çalışmada da UVA'yi de içeren geniş spektrumlu güneşten koruyucu kullanmanın güneş hasarının birçok biyokimyasal etkilerini önlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte güneşten koruyucuların ince kırışıklıkların oluşumu üzerindeki etkilerini inceleyen iyi planlanmış prospektif bir çalışma bulunmamaktadır (73).

Güneşten koruyucular deriyi güneş ışınlarının oluşturduğu hasardan koruma açısından en etkili yöntem olmakla birlikte koruma etkileri içerdikleri koruma faktörleri ile paralel seyretmemektedir. Güneşten koruyucular sahip oldukları faktörün 1/3'ü kadar koruma sağlar ve yeterli etkinliğe ulaşabilmek için en az 2 mg/cm² seklinde uygulanması gerekmektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalarda sub-eritematojenik dozlarda bile DNA hasarının olabileceği gösterilmiştir. Yani güneşten koruyucular yalancı bir korunma hissine neden olmaktadır. Piyasadaki ürünlerin hiçbiri tüm UV ism spektrumunu kaplayan bir koruma sağlamadığı için, bunların kullanımı daha uzun süre güneşte kalınabileceği anlamına gelmemelidir. Ayrıca güneşten koruyucuların içindeki maddeler UV isim ile etkileştiklerinde kendileri de serbest radikal halini alıp, deriden emilerek zararlı etkiler oluşturabilmektedirler (74).

Piyasada çok fazla sayıda güneşten koruyucu ürün seçeneği bulunmaktadır. Bunlar arasından foto-yaşlanmanın önlenmesi amacı ile hastaların ihtiyaçlarına en uygun olanı seçilmeli ve mutlaka düzenli olarak kullanılması sağlanmalıdır.

Anti-aging tedavi yöntemleri;

- Farmakolojik ajanlar (güneşten koruyucular, hidrokinon, retinoidler, antioksidanlar (Vit C, Vit E, selenyum, yeşil çay, kinaraz))
- Fiziksel yöntemler (kimyasal peeling, mekanik peeling, laserler)
- Dolgu maddeleri
- Botox

2.6.1.2. Hidrokinon

Hidrokinon içeren ürünler deri yaşlanmasına ya da foto-yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan pigmentasyon bozukluklarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Renk açıcı etkisi iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Tirozinin oksidasyonunda kompetisyona girerek tirozinaz enzimi için alternatif bir substrat oluşturması ve melanositlerin selektif destruksiyonuna neden olmasıdır. Etkileri genellikle 1-6 ay sonra ortaya çıkmaktadır. Hidrokinon içeren ürünler iritan ve allerjik kontak dermatite, post-inflamatuar hiperpigmentasyona ve nadiren de eksojen okronozis benzeri pigmentasyona neden olabilirler. Hastalar, tedavi süresince ve sonrasında güneşten koruyucuları kullanmaları konusunda bilgilendirilmelidirler. Çünkü minimal bir güneş ışığı bile melanosit aktivasyonuna neden olabilmektedir (75).

2.6.1.3. Retinoidler

Retinoidler vitamin A'nın fonksiyonel ve yapısal analogudur. Hücre diferansiasyonunda, proliferasyonunda, immun sistem üzerinde ve embriyonik gelişmede, intrasellüler nükleer reseptörleri etkileyerek çok sayıda farklı etkiler oluşturmaktadırlar.

Deri yaşlanmasının retinoidler tarafından iyileştirildiğine ait ilk veriler akne tedavisi alan bayanlarda tedavi sonrasında ciltlerinin daha pürüzsüz ve düzgün olmasıyla anlaşılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda tretinoinin, melaninin daha düzenli dağılmasını sağladığı, lentigolarda ve hiperpigmente lekelerde iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir.

Tretinoin kullanımı ile epidermal atipi normale dönmekte ve üst dermiste yeni kollajen oluşumu izlenmektedir. Tretinoin epidermal hücrelerin proliferasyonunu geçici olarak stimüle ederek korneositlerin dökülmesini hızlandırmaktadır. Bu etkilerin sonucunda ince kırışıklıklar düzeliyor deri gerginliği artmaktadır. Ayrıca tretinoinin angiogenesisi indüklemesi de derinin daha parlak kırmızı-pembe görünmesine neden olmaktadır (76).

Tretinoinin anti-aging etkisi, dokuda hasara neden olan metalloproteinazlar üzerine inhibitör etki göstererek ortaya çıkar. UVB ile temas sonucunda matriks metalloproteinazlar (MMP) aktive olarak derideki kollajenin tamamen yıkılmasına neden olurlar.

Fisher ve arkadaşları tretinoin uygulanmasının MMP'nin inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Kollajenaz gibi enzimlerin artışına ek olarak UV teması ile kollajen üretimi de azalmaktadır. Derinin all-trans retinoik asit ile UV teması öncesi tedavi edilmesinin prokollajen sentezi kaybını inhibe ettiği gösterilmiştir. UV teması öncesi derinin topikal retinoidlerle proflaktik olarak tedavi edilmesinin, foto-hasarlanma tedavisindeki kadar etkili olabileceği öne sürülmüştür. Topikal retinoidlerin ışıқта stabilitelerinin bozulması nedeni ile bu ürünler gece kullanılmaktadır, inanılan aksine fototoksik özellikleri yoktur. Retinoid kullanımı sırasında; mutlaka kuru cilde ve çok az miktarlarda kullanılmasına, başlangıçta

aralıklı olarak kullanılmasına, beraberinde asit, C vitamini içeren ürünlerle birlikte kullanılmamasına dikkat edilmelidir.

Tretinoin kullanacak hastaların seçimi konusunda oldukça dikkatli olunması gerekmektedir. Hastaların bu ilacı düzenli kullanmaları ve ömür boyu güneşten koruma sağlamaları gerekmektedir. Ayrıca hastalar, tedavi etkinliğinin ortaya çıkmasının uzun zaman alacağı ve bu tedavi ile bazen hafif iritasyon ortaya çıkabileceği konusunda bilgilendirilmelidirler (77).

2.6.1.4. Antioksidanlar

2.6.1.4.1. Vitamin E (α -tokoferol)

Vitamin E, stratum korneumun lipid yapılarının ve proteinlerinin oksidasyondan korunmasında önemli rol oynamaktadır. Vitamin E'nin lipofilik yapısı deriye uygulanması ve absorpsiyonu için oldukça uygundur. Birçok çalışmada vitamin E'nin hayvan derisine topikal olarak uygulanması ile fotoprotektif etkisi olduğu da gösterilmiştir. Topikal α -tokoferol tavşan derisini UV'nin oluşturduğu eritemden, fare derisinde UV ile indüklenen lipid peroksidasyondan, foto-yaşlanmadan, UV'nin neden olduğu immunosupresyondan ve fotokarsinogenesisden, koruduğu gösterilmiştir. α tokoferol, fotokarsinogenesisi fare derisinde epidermal p53 geninde UV'nin indüklediği sikloprimidine dimer oluşumunu inhibe ederek göstermektedir. Fotoprotektif etkilerine ek olarak alfa tokoferol melanogenesisi de inhibe etmektedir. Ayrıca topikal alfa tokoferolun 290 nm dalga boyunda bir miktar fotoprotektif etkisi de vardır. Şimdiye kadar topikal vitamin E'nin net faydalan konusunda yeterli kontrollü çalışma bulunmamaktadır. Topikal saf α - tokoferol (oral formu) potansiyel bir sensitizandır, direk olarak deriye bu formda uygulanmamalıdır (78).

2.6.1.4.2. Vitamin C (Askorbik asit)

L-askorbik asit aktif formda yaşlanmanın etkilerini serbest radikallerle etkileşerek azaltmaktadır. Antioksidan etkilerinin yanı sıra L-askorbik asit kollajen sentezinde propil ve lizil hidroksilazlar için kofaktör olması nedeni ile önemli rol oynamaktadır. Ayrıca kollajen sentezinin transkripsiyonal regülasyonunda da önemlidir. L-askorbik asit elastin sentezini de inhibe ederek, fotoyaşlanmada ortaya çıkan elastik doku akümüülasyonunu azaltmakta, tirozinazı da inhibe ederek pigment sentezini önlemektedir.

Topikal L-askorbik asitin UVB ve UVA'nın oluşturduğu fototoksik hasara karşı koruma sağladığı, farelerde UVB'nin oluşturduğu immunosupresyona karşı koruma ve kontak allerjenlere karşı tolerans sağladığı gösterilmiştir. Topikal L-askorbik insan derisinde prokollajen I ve III için mRNA seviyelerini ve prokollajen sentezinde önemli rol oynayan enzimleri arttırmıştır.

İnsanlar askorbik asidi sentezleyemedikleri için mutlaka dışarıdan alınmalıdırlar, emilimi kontrol altında olduğu için deriye ulaşan miktar da az olmaktadır. Bu nedenle derideki konsantrasyonu arttırmak için en etkili çözüm topikal olarak uygulanmasıdır (78).

2.6.1.4.3. Selenyum

Selenyum memelilerde oksidatif strese karşı savunmada gerekli olan glutatyon peroksidaz ve tioredoksin reduktaz enzimlerinin fonksiyonu için gerekli bir eser elementtir, bu enzimlerin fonksiyonları selenyum desteği ile artırılabilir. Çeşitli çalışmalarda selenyumun sitotoksisite, DNA oksidasyonu, DNA hasarı, IL-10 ekspresyonu, lipid peroksidasyonu gibi UV hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Oral sodyum selenitin

tüysüz farelerde UV'nin neden olduğu eritemi, ardışık pigmentasyonu ve deri kanseri oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Ama insanlarda oral selenyum verilmesi ile bazal hücreli ve skuamoz hücreli karsinom gelişimi önlenememiştir. İnsanlarda topikal selenyum minimal eritem dozunu, doz bağımlı olarak artırmıştır. Selenyum IL-6,8,10 ve TNF- α 'nın UVB ile indüksiyonunu doz bağımlı olarak inhibe etmektedir. Ayrıca selenyum hücrel ve humoral immunitiyi de uyarılmaktadır. Tüm bu etkileri ile selenyumun anti-kanserojen etkileri vardır. Selenyum ve diğer antioksidanlar daima dengeli beslenmenin bir parçası olarak alınmalıdırlar, aksi takdirde pro-oksidan gibi davranarak DNA hasarına yol açabilirler (69).

2.6.1.4.4. Çinko

Çinko insanlar için esansiyel bir elementtir. Deri ve ekleri çinkodan zengindir ve toplam vücut çinkosunun %20 sini içermektedir. Çinko vücutta birçok moleküle bağlanarak aktivitelerini etkilemektedir. Dokularda önemli antioksidan etkileri vardır. Hücre çalışmalarında UV'nin indüklediği sitotoksisite, DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu gösterilmiştir. Çinko tuzlarının topikal kullanımında güneş yanığı hücrelerinin oluşumu azalttığı gösterilmiştir.

2.6.1.4.5. Melatonin

Melatonin serbest radikalleri, reaktif oksijeni ve nitrojen türlerini direkt olarak nötralize etme yeteneğinin yanı sıra, dismutaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon reduktaz gibi çeşitli antioksidan enzimleri de uyarılmaktadır. Melatonin membran lipidlerini ve çekirdek DNA'sının oksidatif hasara karşı belirgin ölçüde korur ve farelerde cilt kanserini oluşma riskini azaltmaktadır (61).

2.6.1.4.6. Yeşil çay

Uzun yıllardır Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan yeşil çayın, antioksidan ve anti kanserojen etkileri vardır. Antioksidan etkisi içerdiği polifenollere bağlıdır. Bu polifenollerin oral veya topikal alımının hayvan deneylerinde anti kanserojen etkisi olduğu, foto yaşlanmayı da önlediği ve anti-inflamatuvar yanıtı arttırdığı gösterilmiştir. İnsan cildi üzerinde UV ışınlarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiş olsa da bunun uzun dönem etkilerinin araştırılması gerekmektedir (79).

2.6.1.4.7. N-Furfuryladenin e (Kinerase)

Kinaraz bitkisel bir sitokinindir ve hiperpigmentasyon, kabalaşma, ince çizgiler ve sarkmayı azaltıcı etkisi bulunmaktadır. Topikal tretinoin ve AHA'lardan daha az etkili olmasına rağmen, daha az iritan olduğu için bu ajanları tolere edemeyenlerde uygun bir tedavi gibi görünmekle birlikte uzun dönem güvenilirliği ile ilgili kapsamlı çalışmalar yoktur (80).

2.6.2. Cilt Soyma (Peeling)

Tüm ablatif cilt yenileme işlemlerinde deri kontrollü olarak belirli bir derinliğe kadar soyulup yüzeyi daha düzgün, yeni deri oluşumu indüklenmektedir. Bu kontrollü hasarlama işlemi kimyasal ve mekanik yöntemlerle veya lazer kullanılarak yapılabilir. Soyma işlemi, oluşturulan hasarın derinliğine göre yüzeysel, orta ve derin olarak sınıflanmaktadır. Yüzeysel uygulamalarda epidermisin tamamında ya da bazal hücre tabakasına kadar olan kısımlarda, orta derecede soyma işleminde epidermis ve papiller dermiste, derin soymada ise retiküler dermise kadar nekroz oluşturulur.

Foto yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan değişiklikler cilt yenilemenin sık olarak kullanıldığı durumlardır. Glogau sistemi ile hasarın belirlenmesi, uygulanacak tedavinin seçimi açısından oldukça kullanışlıdır. Hasarın derinliğine göre farklı yöntemler tek başına ya da kombine olarak kullanılabilir (81-82, 70).

Kimyasal ve mekanik cilt yenileme endikasyonları

- Foto yaşlanma ve ince kırışıklıklar
- Skar oluşumu
- Preneoplastik ve neoplastik hastalıklar
- Akne vulgaris
- Pigment değişiklikleri
- Diğer cilt yenileme yöntemlerinde ortaya çıkan demarkasyon hatları

2.6.3. Lazerler

30 yıldan daha fazla süredir CO₂ lazer (10600 nm) cilt yenilenmesi için kullanılmaktadır. Bu dalga boyu intra ve ekstrasellüler su tarafından güçlü bir şekilde absorbe edilmektedir. Fakat çevre dokulara verdiği hasar nedeni ile cilt yenilenmesi için çok uygun değildir. Bu nedenle teknolojik ilerlemelerle kısa pulse, yüksek pik gücü olan ve hızlı tarama sistemli CO₂ lazerler kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemler foto-hasara uğramış deri tabakalarında daha hassas kontrol ile cilt yenilemesi yapmaktadırlar. CO₂ lazer resurfacing foto-aging için oldukça etkili olmakla beraber post operatif viral ve bakteriyel enfeksiyon, skar oluşumu ve kalıcı hipopigmentasyon gibi riskleri vardır (83).

2.6.4. Dolgu Maddeleri

Dolgu maddeleri yaklaşık bir asırdır kırışıklıkları ve skarları düzeltmek, konturu iyileştirmek ve dudakları büyütmek için kullanılmaktadır. Kullanılan ajanlar otolog yağ, kadavradan elde edilen kollajen allografları, sığır kollajeninden elde edilen kollajen xenografları, hyaluronik asit ve sentetik materyallerdir. Sığır ve insan kaynaklı kollajenler günümüzde en sık kullanılan dolgu maddeleridir.

2.6.5. Botoks

Botulinum exotoksini (BTX) yüzde estetik görünümü iyileştirmek amacı ile sıklıkla kullanılmaktadırlar. Yaşlanma ile ortaya çıkan glabellar çizgiler, horizontal alın çizgileri, kaz ayakları gibi hiperdinamik çizgilerin tedavisinde oldukça başarılıdır. Son yıllarda yüzün orta ve alt kısmındaki ve boyundaki estetik endikasyonlar için de kullanılmaya başlanmıştır. Bu tedavi ile sonuçlar uygulamadan sonra günler içinde ortaya çıkmakta, uygulamanın kendisi kısa sürmekte ve yan etkileri az olmaktadır.

2.7. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres genel olarak prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu patolojik bir tablodur. Canlı organizmadaki serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan yan ürünlerdir ve başlıca hedef molekülleri çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitleridir (84).

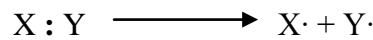
Oksidatif stres ve buna bağlı biyolojik etkilerin birçok hastalıkla ilişkisi olduğunu gosteren çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaktadır. Bu hastalıklar arasında kalp damar hastalıkları, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, bazı kanser türleri, nörodejeneratif hastalıklar, katarakt, respiratuvar distres sendromu, romotoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları bulunmaktadır (85,86). Ancak serbest radikal ve antioksidan sistemlere ait enzimlerin referans değerleri hakkında literatürde bazı çalışmalar olmasına rağmen halen çok fazla veri bulunmamaktadır (87,88,89).

2.7.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen en çok kabul gören tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir. Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede bir birine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur (90).

Bir serbest radikal  yolla ortaya çıkabilir: (91)

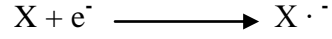
1. Kovalent bağ taşıyan bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesiyle oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturana her iki elektron atomlardan birisinde kalır.



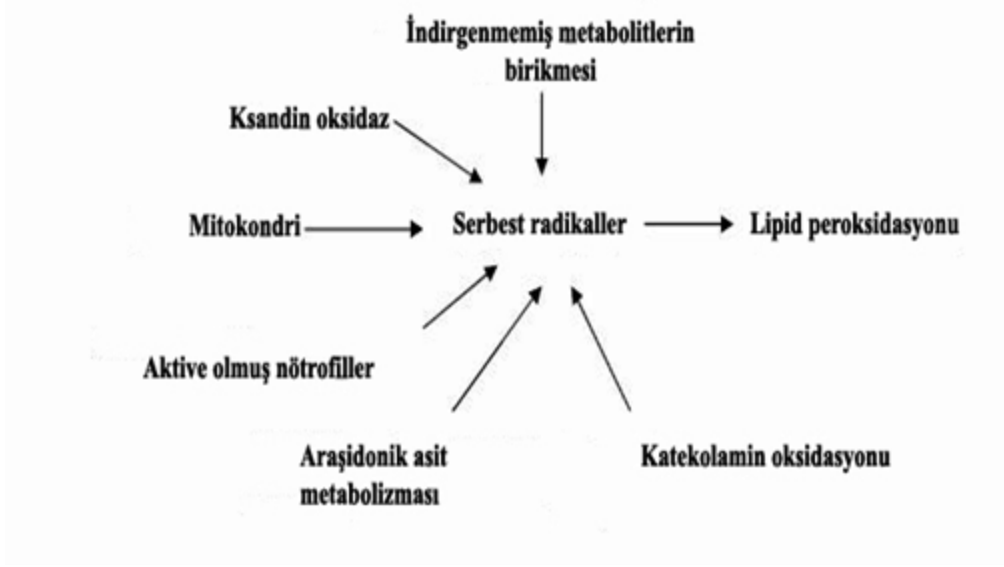
3. Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (90). Serbest oksijen radikalleri yapılarındaki dengesizlik nedeni ile çok aktif olduklarından tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliği gösterirler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (92).

2.7.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Moleküler oksijen (O₂), birçok metabolik olayda terminal elektron akseptörü olarak görev yaptığından, aerobik canlılar için hayati öneme sahiptir. Fizyolojik şartlarda gerçekleşen pek çok hücrel aktivite, SOR oluşumuna yol açabilmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.8. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları

Oksijen dünyada en çok bulunan moleküldür. Oksijen; travma, ödem, oklüzyon gibi dokuda beslenme ve dolaşım bozukluğu meydana getirebilen durumlarda doku tarafından üretilen bazı metabolitlerle reaksiyona girerek serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadır. Organizmadaki serbest radikal oluşma yolları Çizelge 2.2’de gösterilmiştir. Bu serbest oksijen radikalleri dokuda daha fazla hasar meydana getirebilmektedir (93). Patolojik olarak önemli oksijen türevleri Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Organizmada serbest radikal oluşma yolları

Organizmada Serbest Radikal Oluşma Yolları
A. Eksojen Faktörler:
1. Diyetsetel
a. Çoklu doymamış yağ asitlerince
b. Alkol alımı
c. Fazla kalorili beslenme
d. Hayvansal proteinlerce zengin beslenme
e. Aşırı demir ve bakır alınması
f. Yiyeceklerin pişirme yöntemlerindeki hatalar
2. Çevresel
a. Sigara dumanı
b. Hava kirliliği (O ₂ , NO ₂ , SO ₂ , hidrokarbonlar)
c. Diğer kirleticiler (asbest, pestisitler vs.)
d. Radyasyon
3. İlaçlar
a. Antikanser ilaçlar (adriamisin, vs.)
b. Glutatyon tüketen ilaçlar (asetaminofen, kokain, vs.)
B. Eksojen Faktörler:
1. Fiziksel egzersiz / sedanter yaşam
2. Stres
3. Yaşlılık
4. Doku hasarı ve kronik hastalıklar (ateroskleroz, kanser, kronik inflamasyon, vs.)
5. Diyetsetel antioksidanların sağlanması etkileyen koşullar (iştahsızlık, kolestaz, malabsorbsiyon, vs.)

Çizelge 2.3. Patolojik olarak önemli oksijen türevleri

Patolojik olarak önemli oksijen radikalleri:	
Adı	Moleküler Formülü
Süperoksit radikali	O_2^-
Hidroksil radikali	$\cdot OH$
Nitrik oksit	$NO\cdot$
Ferril iyonu	FeO^{+2}
Perferril iyonu	FeO_2^{+2}
Allil	$R\cdot$
Aloksil	$RO\cdot$
Peroksil	$ROO\cdot$
Radikal olmayan oksijen türevi bileşikler:	
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Singlet Oksijen	1O_2
Ozon	O_3
Hipoklorit asit	$HOCl$
Lipit hidroperoksit	$LOOH$
Peroksinitrit	$ONOO\cdot$

2.7.1.2. Lipit Peroksidasyonu (LP)

Günümüzde serbest radikaller nedeniyle, biyomoleküller, membranlar ve dokularda meydana gelen oksidasyonun pek çok patolojik olayda önemli rol oynadığı kabul edilmektedir

(92). Organizmada herhangi bir nedenle aşırı miktarda üretilen SOR'nin nükleik asitler, lipitler, çeşitli proteinler ve polisakkaritler gibi biyomoleküllerle etkileşmesi, hücre ve doku hasarlarına yol açmaktadır. Bunların içerisinde oksidatif hücre hasarı bakımından en önemli olanı, membran lipitlerinin oksidasyonudur (94).

LP; fosfolipit, glikolipit, gliserid ve sterollerin yapısında bulunan poliansature yağ asitlerinin SOR etkisiyle alkol, aldehit, hidroksiasit, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılmasını kapsayan reaksiyonlar dizisidir. Yüksek oranda fosfolipit içeren biyomembranlar ve subsellüler organeller, organizmada peroksidasyonun gerçekleştiği başlıca yerlerdir (95).

2.7.1.2.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması

LP'nun oluşumu başlama, yayılma ve sonlanma şeklinde 3 aşamada gerçekleşir: (95)

Başlama: Redoks katalisti olarak görev yapan Fe^{+++} veya Cu^{++} gibi geçiş metal iyonlarının varlığında, serbest radikallerin hepsi, LP'nu başlatabilir. Peroksidasyon, serbest radikallerin, poliansature yağ asidinin metilenik yan zincirinden bir hidrojen atomu çıkarmak için yaptıkları atakla başlar. Böylece, yağ asidi zinciri üzerinde karbon merkezli bir lipit radikali oluşur. Radikal oluşumunu takiben yağ asidi zincirindeki çift bağlar, konjuge dien şeklinde yeniden düzenlendikten sonra, O_2 ile reaksiyona girerek peroksi radikali oluştururlar.

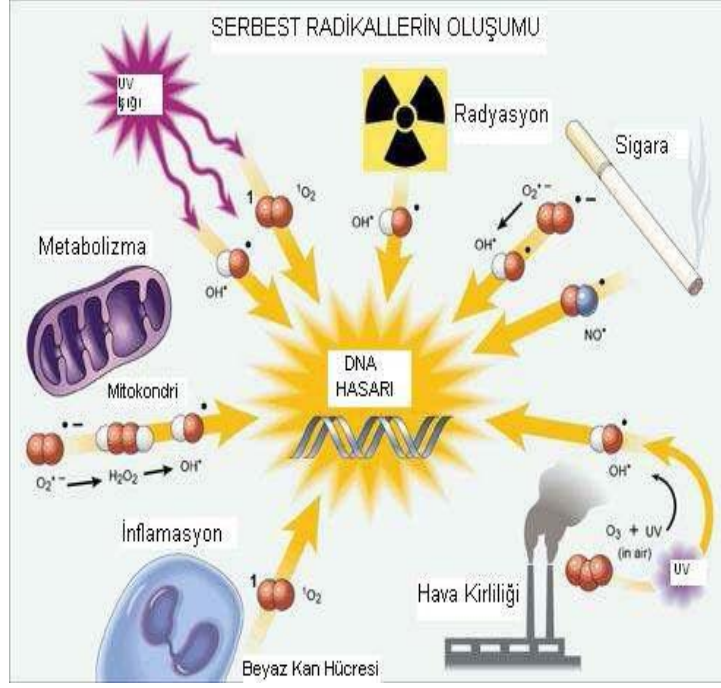
Yayılma: Peroksi radikali diğer bir peroksi radikaliyle birleşebilir ya da membran proteinleriyle etkileşebilir. Fakat en önemlisi, bu radikallerin kendilerine komşu yağ asidi zincirlerinden hidrojen atomlarını çıkartabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri, lipit hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir.

Sonlanma: Lipit hidroperoksitleri, hem proteinleri veya bazı metal kompleksleri varlığında, siklik peroksitler ya da endoperoksitler üzerinden çeşitli ürünlere yıkılmaktadır. Çoğu, biyolojik olarak aktif olan bu ürünler -OH, -OOH, -COOH veya -CHO grupları içeren kısa zincirli yağ asitleri ile etan ve pentan gibi gazlardır.

2.7.1.2.2. Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları

Peroksidasyon sırasında oluşan peroksi radikalleri, lipit hidroperoksitler ve bunların yıkım ürünleri, biyomembranlar, subsellüler organeller ve enzimler üzerinde toksik etkilerini gösterirler. Membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini değiştirirler. Böylece, membranın H^+ ve Ca^{++} gibi diğer iyonlara karşı geçirgenliği artar ve transmembran iyon gradiyenti bozulduğundan membran potansiyelinde düşme gözlenir. Sonuçta membran akışkanlığı azalır. Membrana bağlı reseptörlerin ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarlar. Çünkü enzimler dahil birçok protein yapısında bulunan serbest tiyol (-SH) gruplarını, disüflitlere (S-S) oksitleyerek, bu bileşiklerin aktivite yada fonksiyonlarının değişmesine neden olurlar.

Subsellüler organellerin yapısını ve fonksiyonlarını bozarlar. Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyonu çözerler, mikrozomal enzim aktivitelerini değiştirirler, hatta lizozomal hidrolitik enzimler gibi organel içeriklerinin de salınımına yol açarlar (95). Serbest radikallerin oluşma yolları ve yapmış olduğu DNA hasarı Şekil 2.2.'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.9. Serbest radikallerin oluşma yolları ve yapmış olduğu DNA hasarı

2.7.1.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Hasarının Dokular Üzerine Etkileri

Serbest oksijen radikalleri ile makromoleküller (proteinler, DNA/RNA, lipitler, karbonhidratlar) arasındaki etkileşimler reversible ve irreversible oksidatif hasara yol açabilir (96).

DNA/RNA üzerine olan etki; deoksiriboz halkasının ayrılması, baz hasarı, zincir kırılmaları sonucunda mutasyonlar, translasyonel hatalar ve protein sentezi inhibisyonu şeklindedir.

Proteinler üzerine olan etki sonucu agregasyon ve çapraz bağlanma, parçalanma ve kırılma, tiyol grupları modifikasyonu meydana gelir. Sonuçta enzim aktivitelerinde değişimler, iyon transportu değişimleri, hücre içine Ca^{+2} girişinde artış olur.

Çoklu doymamış yağ asitlerine etki; lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşumu, hücre membran akışkanlığında azalma, permeabilite değişiklikleri ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere yol açar.

Karbonhidratlar üzerine olan etki sonucu özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H₂O₂, peroksitler ve oksoaldehitler (glioksal vs.) oluşur. Antimitotik özellik gösteren oksoaldehitler karsinogenez ve yaşlanmada rol oynarlar (96). Serbest radikallerin neden olduğu başlıca hastalıklar Çizelge 2.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Serbest radikallerin neden olduğu başlıca hastalıklar

Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hastalıklar
1. Ateroskleroz
2. Kanser
3. Alzheimer
4. Parkinson
5. Esansiyel hipertansiyon
6. Katarakt
7. Fankoni anemisi
8. Bloom sendromu
9. Amiloidoz
10. Diabetes mellitus
11. Lanek sirozu
12. Amiyotrofik lateral skleroz

2.7.2. Antioksidanlar

Organizmada tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırasında sürekli olarak oksidanlar üretilmektedir (97). Bu reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta, antioksidan savunma sistemleri olarak bilinen bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (90). Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge halinde bulunur (97). Bu radikallerin oluşma hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu durum sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (98).

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi, hem de hücre dışı savunma mekanizmalarıyla etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma albümin, bilirubin, transferrin, serüloplazmin, ürik asit, vitaminler gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadırlar. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (99).

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu yollarla gösterirler:

- Serbest radikal oluşumunun önlenmesi veya serbest radikallerin ortamdan uzaklaştırılması
- Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması
- Çöpçü (scavenger) etki; serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek onları yakalama ve daha az reaktif başka bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirme (antioksidan enzimler)
- Söndürücü (quencher) etki; serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girip onlara bir proton aktararak aktivitelerinin azaltılması veya inhibe edilmesi (flavanoidler, vitaminler)

- Onarıcı (repair) etki
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki; serbest oksijen radikallerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri bağlayarak zincir reaksiyonlarının yavaşlatılması veya sonlandırılması (transferrin, ferritin, serüloplazmin).

Birçok antioksidan bu etkilerden birkaç tanesini bir arada gösterebilmektedir (97).

2.7.2.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

2.7.2.1.1. Süperoksit Dismutaz

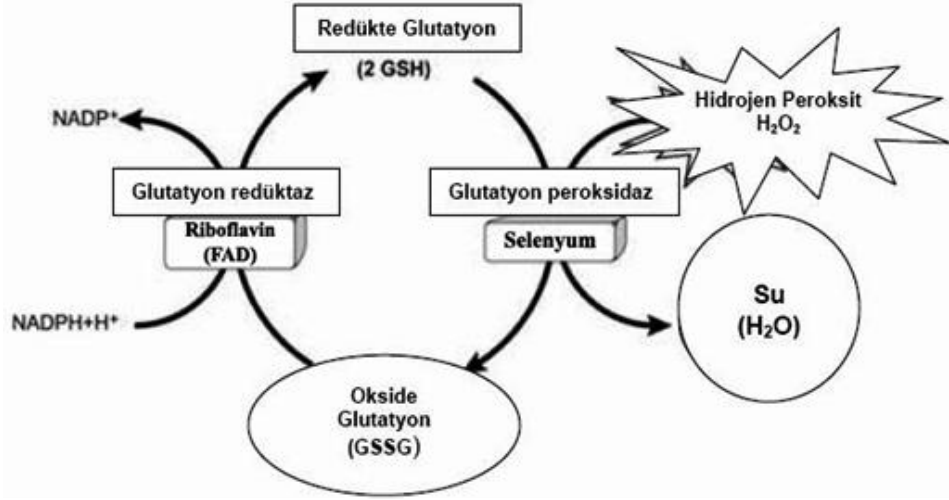
Bu enzim süperoksidin, hidrojen peroksid ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hücresel düzeydeki süperoksidin en önemli düzenleyicisidir. İnsanlarda iki tipi bulunmaktadır (100). Bunlardan biri sitozolde bulunan dimerik, bakır ve çinko içeren izomeri (Cu-Zn SOD), diğeri ise mitokondride bulunan tetramerik yapıdaki mangan ihitiva eden izomeridir (MnSOD) (101). SOD'ler metalloproteinler olup dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek, yani bir süperoksid molekülünü oksijen molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksid molekülünü H_2O_2 'ye indirgeyerek çalışmaktadırlar. Dismutasyon olayı normalde pH 4,8 de en hızlı olacak şekilde cereyan etmektedir. Fizyolojik şartlar altında bu reaksiyon oldukça yavaştır. Fizyolojik pH'da SOD varlığında bu tepkime 4 kat daha hızlı çalışmaktadır. SOD tarafından meydana getirilen H_2O_2 'nin katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından metabolize edilmesi nedeniyle SOD, katalaz ve GPx ile birlikte çalışmaktadır. İnsanlarda SOD'nin doğuştan yokluğu tespit edilememiştir. Bunun nedeni bu tarz mutasyonların fetal oluşlarıdır. Romatoid artrit, diabetes mellitus, Behçet hastalığında süperoksid üretimi ile temizleyici sistem arasında negatif bir ilişki olduğu tespit edilmiş, bunun yanı sıra Down sendromluların eritrositlerinde Zn SOD'nin yüksek olduğu, prematürelerin ve Psöriasislerin lökositlerinde ise düşük olduğu gösterilmiştir (102).

2.7.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz

Hiperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Her biri selenyum içermekte olan dört alt tipi bildirilmiştir. Hidrojen peroksid ve lipit hidroperoksidlerin yıkımını katalizleyerek membran lipitlerini ve hemoglobini oksidatif strese karşı korumaktadır. Hidroperoksidler enzim aktivitesi ile indirgenmekte iken glutasyon ise yükseltgenmektedir. GPx'in hidrojen peroksid ve hidroperoksidleri indirgemesi glutasyon redüktaz ve NADPH mevcudiyetine bağlıdır (102,103). Glutasyon redüktaz glutasyonun okside formunun redüksiyonundan sorumludur. GPx aktivitesindeki azalma şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır ve bu durum özellikle selenyum eksikliği durumlarında karşımıza çıkmaktadır. Çünkü selenyum bu enzimin integral bir parçasıdır. E vitamini yetersizliği durumlarında membranları oksidatif strese karşı GPx korumaktadır (104).

2.7.2.1.3. Glutasyon Redüktaz

GPx'in reaksiyonu sırasında oluşan okside glutasyonu (GSSG) redükte glutasyona (GSH) dönüştürerek dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir. Bu kataliz gerçekleştirilirken koenzim olarak NADPH kullanılır. GR enziminin hücresel fonksiyonu GSH:GSSG oranının 20:1 olarak kalmasını sağlamaktır (Şekil 2.3).



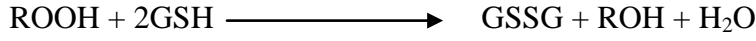
Şekil 2.10. Glutasyon Döngüsü (105)

Normal şartlarda GR ile GSSG'nin redüksiyonu oldukça hızlıdır, ancak oksidatif stres söz konusu olduğunda GSSG birikimi olabilir. Bu durumda GSSG ya hücrelerden transport olur veya protein sülfhidrilleri ile etkileşerek protein-disülfidlenmiş glutasyon ürünleri oluşumuna neden olur (106).

2.7.2.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Glutasyon-S-transferazlar, hücresel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir. Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir (107). Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler.

GST



GST'ler, glutatyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır (108).

2.7.2.1.5. Katalaz

Bir hemoproteindir. Dokularda farklı düzeyde bulunur. En fazla karaciğer ve böbrekte, en az ise bağ dokusunda bulunmaktadır. Dokularda başlıca mitokondri ve peroksizomlarda bulunmakla beraber, nadiren sitozolde de bulunabilmektedir. SOD ve katalaz beraber çalışmaktadır; birinin yaptığı hidrojen peroksidi diğeri su ve oksijene dönüştürmektedir. İnsan eritrositleri katalazdan zengindir ve kandaki katalaz aktivitesi eritrositlerden kaynaklanmaktadır (101).

2.7.2.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

2.7.2.2.1. Antioksidan Vitaminler

Vitaminlerin yeterli miktarda alınmaları normal büyüme gelişme ve sağlığın sürdürülebilmesi için gereklidir (109). Günümüzde vitaminlerin nutrisyonel durumu kandaki konsantrasyonlarının ölçümü ile ortaya çıkmaktadır.

Vitaminlerin günlük alınması gereken miktarları (The Recommended Dietary Allowance; RDA) Amerikalı ve Kanadalı toplumların serum veya kan referans değerlerinin alt sınır konsantrasyonunu sağlayacak vitamin alınımı temel alınarak yapılmıştır (110).

Vitamin eksikliği yaygın olmamasına karşın doğumsal metabolizma bozukluklarında veya diyet ile alımının ciddi şekilde kısıtlanması sonucunda eksiklik görülebilir. Sıklıkla karşılaşılan vitamin eksikliği nedenleri beslenme bozuklukları, besinlerin emilimini etkileyen bazı hastalıklar, aşırı kan kayıpları, hemodiyaliz, metabolik nedenler ve bazı ilaçların kullanılmasıdır. Vitamin düzeylerinin arttığı durumlar RDA düzeylerinin aşıldığı zamanlarda görülmektedir (111).

Vitamin düzeylerinin referans aralıkların dışına çıkmasına neden olabilecek durumlarda kişilerin vitamin düzeylerinin laboratuvar testleri ile belirlenmesi gerekliliği önem kazanır. Bu gereksinim yeni yöntemlerin kullanılması ile elde edilen sonuçların geliştirilmesini ve değerlendirilme konusunu gündeme getirir (111).

Günümüzde laboratuvarlarda plazma, tam kan veya eritrositlerde vitaminlerin konsantrasyonlarını, vitamin durumunu kesin olarak değerlendirecek objektif metodlar ve veriler halen bulunmamaktadır (109). Kullanılan RDA değerlerinin ölçüm metodlarından bağımsız referans değerler olmadıkça kesin olamayacağı bildirilmiştir (110).

Vitamin C (askorbik asit), diyetle alınması zorunlu bir vitamindir. Biyolojik sıvılarda çözünen vitamin C'nin antioksidan etkileri; (112)

- Güçlü bir elektron donörüdür ve redükleyici ajandır, serbest radikallere karşı scavenger görevi yapar
- O_2^- radikali, OH radikali ve hipokloröz asidi indirger
- Aktif nötrofil ve monositlerden kaynaklanan oksidanları nötralize eder
- Demir ve bakır içeren reaksiyonlara etki eder
- Lipit peroksidasyonu başlamadan önce sulu ortamdaki peroksil radikalleri ile direkt olarak reaksiyona girerek membranları peroksidatif hasardan korur
- LDL oksidasyonunu önler ve elektronları membrandaki E vitaminine transfer eder
- Oluşan E vitamini radikalini redükte ederek E vitaminini yeniden oluşturur, böylece E vitamininin yeniden kullanılmasını sağlar. Ayrıca antiproteazların oksidan maddelerle inaktive olmasını engeller (113).

Vitamin E yağda çözünen esansiyel bir vitamindir. Vitamin E'nin, insan dokusunda en fazla bulunan ve en yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan alfa tokoferol formu antioksidan aktivitesi de en yüksek olan formudur (114,115). Alfa tokoferolün yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka antioksidan aktiviteden sorumludur (116).

- Alfa tokoferol oluşan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerine karşı çok güçlü bir scavengerdir (127).
- E vitamini, peroksidler üzerindeki nötralize edici etkisini kendisinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline transfer etmek suretiyle yapar.
- Tokoferol hücre membran fosfolipitlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırarak serbest radikal etkilerinden korur ve bu nedenle zincir kırıcı antioksidan olarak bilinmektedir (117).

Vitamin A siklohekzenil halkası taşıyan bir poliizopren bileşiğidir (111). Doğadaki en potent ve en iyi bilinen provitamin A, β -karotendir (118). A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten antioksidan özelliklerini söndürücü etki ile göstermektedir. Karotenoidlerin yapısındaki konjuge çift bağlar antioksidan aktiviteden sorumludur. Son derece güçlü bir singlet O_2 temizleyicisi olan β -karoten ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleri ile de doğrudan reaksiyon vererek lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu önleyebilir. Bu reaksiyon esnasında β -karoten membran iç yüzünde antioksidan rol oynarken vitamin E dış yüzde görev yapar (119). Her β -karoten molekülü iki peroksil radikalini bağlayarak ortamdan uzaklaştırır. Ortamdaki oksijen konsantrasyonunun yüksek olması halinde ise reaktif bir peroksil radikali oluşur (119).

Ayrıca B vitaminlerinden olan B_1 , B_2 ve B_6 'da antioksidan etki gösterirler. B_1 ve B_2 vitaminleri etkilerini gösterirken diğer vitaminler veya enzimler ile etkileşirken (120), B_6 vitamini direkt etki gösterir (121).

2.7.2.2.2. Albümin

Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Yüksek konsantrasyonlarda (40-60 mg/ml) bulunur. Albümine bağlı bakır, Fenton reaksiyonuna katılabilir fakat albümin yüzeyinde oluşacak olan OH radikali albümin tarafından temizlenir ve radikalın serbest solüsyona kaçmasına izin vermez. Bu biyolojik olarak önemli olmayan, albümine ait bir reaksiyon örneğidir. Aynı zamanda miyeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'i hızlı bir şekilde temizler (98,99).

2.7.2.2.3. Bilirubin

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağlı olarak taşınan bir safra pigmentidir. Yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruma görevine sahiptir (98,99).

2.7.2.2.4. Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipit peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır (98,99).

2.7.2.2.5. Serüloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmı akut faz proteini olan serüloplazminden kaynaklanır. Serüloplazmin oksijen radikal ara ürünleri salınmaksızın Fe(II)'yi Fe(III)'e oksitler. Serüloplazmin demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer (98,99).

2.7.2.2.6. Ürik Asit

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği, antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir (98,99).

2.8. Hücre Kültürü

Hücrelerin dokudan mekanik yollarla ve bunu takiben de proteolitik enzimlerle muamele edilerek tek hücre veya küçük kümeler halinde elde edilmesine ve bunların bir besiyeri ile cam veya plastik şişelerde doku ile bağlantısı olmadan in-vitro olarak çoğaltılmasına hücre kültürü denir. “Doku ve organ kültürü” deyiminden doku ve organ parçalarının genel özellik ve normal fonksiyonlarını korumak şartı ile in-vitro olarak korumaları ve kültüre edilmeleri anlaşılır.

Hücre ve doku kültürlerinin kullanılmasıyla moleküler biyoloji ve tıp alanında son yıllarda büyük aşamalar sağlanmış, hastalıkların epidemiyolojisi, patogenez, teşhis ve tedavisinde büyük aşamalar kaydedilmiştir. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalar, fizyologların bir organizmadaki çeşitli organ ve dokuların organizmanın ölümü ile birlikte aynı zamanda ölmedikleri, madde metabolizmalarının bir süre daha devam ettiği saptamaları gözlemlerine dayanır.

Hücre ve doku kültürü üretmek için kullanılan vasatlarda, hücre metabolizma faaliyetlerinin devamı ve hücrelerin çoğalması bazı belli maddelerin temini ile sağlanabilir. Bunları hücre, diğer moleküllerden kendisi sentez edemez ve gerekli maddeleri, ortama ilave edilen mediumlar sağlar. Bu mediumlar doğal ve sentetik materyallerin çeşitli kombinasyonlarını kapsar. Hücre üretme vasatları, organlardan hücrenin ayrılmasından sonra doku tabakası meydana gelene kadar hücrelerin üretilmesi için kullanılır. Hücre üretme

vasatları genel olarak serumla birlikte hücrelerin çabuk üremelerini sağlayan diğer maddeleri kapsarlar. Hücreleri in vitro çoğaltabilmek için en iyi ortam, in vivo ortamlarına yakın bir ortam sağlayarak mümkündür.

Hayvan hücreleri in vitro iki değişik yolla çoğalır. Katı bir ortama mesela şişenin veya buldukları kabın sathına yapışarak veya besi yerinde asılı olarak çoğalır. Bunlardan birincisine “monolayer kültürler” denir. Non transforme hücreler bir satıha yapışarak çoğalır. Süspansiyon şeklinde üreyemezler. Yani bunların süspansiyon kültürleri yapılamaz. Bunların yoğunluğu artıp monolayer hale geldiklerinde üremeleri durur.

Transforme hücreler daha değişik çoğalma yolu izlerler. Bunlar monolayer durumdan multilayer duruma geçerler. Teorik olarak devamlı çoğalabilirler. Transforme hücreleri süspansiyon kültür halinde seri bir şekilde üretmek mümkündür. Süspansiyon kültürlerin avantajı tripsinizasyona ihtiyacı olmadan hücrelerin devamlı yenilenebilmeleridir.

2.8.1. Kültüre İnsan Hücreleri

Hücre kültürü ve doku kültürü deyimleri bugün birbirinin yerine kullanılmaktadır. Doku kültürü, bir organdan-dokudan alınan örneğin hücre bütünlüğünün bozulmadan kültüre ortamına alınmasından oluşmaktadır. Hücre kültüründe ise bu doku parçasındaki hücrelerin ayrımlanarak bütünlükten izole edilmiş bir şekilde kültüre alınmalarından oluşmaktadır. İzole hücrelerin kültür teknikleri 1950’lerde geliştirilmiş hücre tipleri kültüre edilmiş ve biyokimyasal çalışmalarda kullanılmıştır.

İlk hücre dizisi insan over kanserinden türetilmiş ve HeLa olarak adlandırılmıştır. Bu hücreler aneuploidirler ve her süspansiyonda, uygun kapta karıştırılmak veya cam, plastik gibi sert bir desteğe bağlanmak kaydıyla büyüyebilirler. HeLa hücreleri agarozda koloniler

oluşturabilir, büyüme için normal hücelere göre daha az seruma gerek duyarlar ve immün yetmezliği olan farelerde tümör meydana getirebilirler. Bu çeşitli fenotipler, in vitro hayat süreleri belirsiz olan hücelerin tipik özellikleridir.

HeLa hüceleri çeşitli temel hücre biyolojisi ve somatik hücre genetik çalışmalarında çok yararlı olmasına rağmen, bu hücelerin her biri tek bir donörden türetildiği için çok yönlü bireysel analizlerde yararlı değildir.

Deri fibroblastı ve lenfoblastlar bu tip çalışmalar için en kolay temin edilebilecek iki hücre tipidir.

Fibroblast deri biyopsisinden türetilen untransforme hücelerdir, diploid ve kültürde 10 ile 100 nesil arasında sınırlı bir yaşam süresine sahiptirler. Her bir hücre nesli donörün yaşı, biyopsi bölgesi, kültür methodu ve donörün genotipine bağlı olarak karakteristik ve çoğalabilen bir yaşam süresine sahiptir.

Fibroblastların büyümesi için solid bir substrat gereklidir. Bu cam veya coated plastik ile sağlanabilir.

Bugün biyokimyasal bozuklukların prenatal tanısı mümkündür ve ekseri aminoasitlerin ekstraktları ile çalışılarak yapılır. Bu hüceler fetusun çevresindeki amniotik sıvıda mevcuttur ve transplasental amniosentez ile uterusun alınan sıvıdan bilinen hücre kültür teknikleri kullanılarak kültüre edilebilirler.

Amniosit yüzeye tutunarak büyürler ve fibroblast gibi in vitro olarak sınırlı bir yaşam süresine sahiptirler. Amniosit kültürlerinde deri fibroblasttakine göre çok daha fazla morfolojik varyasyon vardır. Bugün deri biyopsilerinden veya insan sütünden yararlı epitelial hücre kültürleri geliştirilmiştir. Fibroblastlar veya lenfoblastlarda görülmeyen fenotipler eksprese edilecekse epitelial hüceleri kullanmak yararlıdır. Böylece analiz edilebilen biyolojik sistemlerin yayılım alanı genişletilebilir. Diğer yandan epitelial hüceleri kültüre etmek ve pasaj yapmak daha güçtür ve fibroblastlara göre in vitro daha kısa bir yaşam süresine sahiptir.

2.8.2. Kültüre Edilmiş İnsan Hücrelerinin Avantaj ve Dezavantajları

İnsan biyolojisi, genetiği ve biyokimyası ile ilgili çalışmalar tüm avantajları ve dezavantajları sağlayacak, herhangi bir insan donöründen fibroblast veya lenfoblast kültürleri yapmak mümkündür. Homojenöz kültürler olmaları bu hücrelerin avantajıdır.

Kültüre hücrelerin bu avantajından yararlanılarak biyokimyasal ve genetik analizler yapılmaktadır.

Hücre kültürleri Dünya'nın bir yerinden öbür yerine postayla gönderildiğinden beri, nadir genetik hastalıklarla ilgili çalışmalarda laboratuvarlar için materyal elde etmek mümkündür. Son yıllarda stoklanan hücre kültürlerinden geniş bir koleksiyon oluşturulmuştur. Bu da bilim adamları için daha yararlı olmuştur.

Kültüre hücrelerin diğer bir avantajı ise donörün biyolojik çevresinden izole edilebilmesidir. Eğer kan ve idrar örneklerinde biyokimyasal farklılıklar bulunursa, hastanın genotipi ile bu gözlemler arasındaki ilişkiyi yorumlamak gerekir. Donör hasta beya ilaç tedavisi altında olabilir ve bu faktörler genotipten bağımsız biyokimyasal parametreleri etkileyebilir. Bu şekildeki kültüre hücreler kontrollü şartlarda büyütülerek kan ve idrar ölçümlerini etkileyen bir çok faktör elimine edilebilir.

Hücre kültürleri her bir donörü ölümsüz hale getirir. Hücreler, gliserol veya dimetilsülfoksit içeren mediumda uzun zaman periyodlarında, sıvı nitrojene daldırılarak saklanabilir. 10 veya daha fazla yıl saklanan donmuş kültürler tekrar kullanılabilir. Ciddi metabolik anomalileri olan ölmüş hasta numunelerinde bu hücrelerin saklanması, daha önce mevcut olan biyokimyasal problemin daha sonra araştırılabilmesine olanak sağlar. Bu bilgiler daha sonra aileye danışılarak, sonraki gebeliklerin düzenlenmesinde veya bundan etkilenen çocukların da tedavisinde yararlı olur.

Sonuç olarak, hücre kültürleri genetik çalışmaların yapılabilmesini sağlar. Karışık genotipli hücre dizileri sağlayan teknikler vardır.

Kültüre hücrelerin kullanımında belli başlı iki dezavantajdan biri ilgili fenotipin eksprese olamaması, diğeri ise kültür hücrelerinin değişkenlik kaynağı oluşturabilmesidir.

2.8.3. Hücre Kültürünün Genel Durumları

İn vitro hücre büyümesinde temel ihtiyaçlar 1950'lerde tespit edilmiştir. Hücreler günümüzde rutin olarak kültüre edilmektedir. Medium, enerji kaynağı olarak glukoz, bunun yanında esansiyel aminoasitler, vitamin ve mineraller içerir. Tamponlama kısmen fosfat tuzları ile en fazla da $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ sistemi ile sağlanır. Bu sisteme ilaveten veya bunun yerine kullanılabilen uygun birkaç sentetik tampon (Hepes, vb.) vardır. İnkübatör, hücreler için gerekli $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'nin devamı için ısı kontrolünü de sağlar. Ozmotik şartlar, mediyuma NaCl ilave edilerek sağlanır.

Kültür, kültür hücreleri için kullanılan materyal veya çalışan kişideki mikroorganizmalar ile kontamine olabilir. Mikroorganizmaların varlığı bazen kaba kontrole belirgin olarak görülürken, her zaman durum böyle değildir. Kontaminasyonu yansıtan ayrıntılı protokoller mevcuttur ve hücre kültürlerine başlanırken bunlardan yararlanılması gerekir.

Kontamine kültürleri kurtarmak güçtür ve eğer kesin olarak esansiyel değilse, kontaminasyon diğer hücre dizilerine sıçramadan önce atılmalıdır. Hücre kültürlerinden başarılı bir şekilde mikoplazma eliminasyonunun makrofajlar, antibiyotikler veya 5-bromourasil kullanılarak yapılabileceği rapor edilmektedir. Steriliteyi sağlamak için tek güvenilir metod bir rutin gözetim programı kurmaktır. Özellikle eğer kendi hücre dizilerimizde mikoplazma yok ise, diğer laboratuarlardan aldığımız kültürleri kullanmadan önce karantinaya almalı ve test etmeliyiz.

2.8.4. Biyolojik Aktivitenin Ölçümü

Kültüre hücreler biyokimyasal ölçümler için kullanıldığında hücrelerin canlılık ve büyüme durumları ekstraktlar hazırlandığı zaman direkt olarak ölçülebilir. Aksine, benzer olarak dokular ile çalışıldığında, deneyi yapan kişi, dokunun dikkatle kesilip kullanılmasının haricinde, hücrenin canlılığını kontrol edemez. Hücre popülasyonunun canlılığı birkaç şekilde ölçülebilir. En kolay boyama boya alma ölçümüdür. Hücreler tripan blue ile muamele edilir, daha sonra bir hemasiyometrede mikroskop altında incelenir. Mekanik olarak tahrip olmuş veya metabolik olarak inaktive hücreler boyayı alamaz ve mavi görünür.

Boya almayan hücrelerde replike olmayacak şekilde tahrip olabileceğinden hücrenin metabolik bütünlüğünden çok, proliferatif kapasitelerini ilgilendiren bir çalışma yapılıyorsa daha başka deneysel yöntemler kullanılmalıdır. Hücre kültürlerinin büyümesi veya plating efficiency (plate randımanı) proliferatif kapasitelerin ölçümünde kullanılabilir.

Kültür hücrelerinin sayısındaki artış, elektronik bir cell counter kullanılarak ölçülür. Deneyin tamamı bir haftayı almaktadır, çünkü insan hücreleri yaklaşık 24 saatte iki katına çıkmaktadır.

Deri fibroblastları düzenli büyüme özelliklerine sahiptir ve hücreler çoğalıp mevcut yüzeyi doldurduğunda replikasyon durur ve hücreler istirahat fazına girerler. Eğer böyle hücreler yeniden süspanse edilir (örneğin tripsinizasyon ile) ve dilüe edilir ise, hücreler yeniden büyümeye başlar ve bir günlük yavaşlama periyodunu takiben, yaklaşık 24 saatlik bir sürede hücre sayısı iki katına çıkar. Bu süre in vitro kültürün yaşına, mediumdaki serumun miktarına ve donörün genotipine bağlıdır.

Plating randımanı deneyleri, büyüme eğrilerinden çok proliferasyon gücünü ölçer. Fibroblastlarda az sayıda hücre direkt olarak flasklara ekilir ve iki haftalık bir inkübasyondan

sonra koloniler sayılır. Bir hücre dizisinin plating randımanı belirli büyüklükteki koloniler (ekseri 50 hücre veya daha fazlası) veren hücrelerin yüzdesi şeklinde saptanır.

2.8.5. Kültüre Hücreler ile Biyokimyasal Ölçümler

Kültüre insan hücreleri, intrasellüler metabolitlerin konsantrasyonları, enzimatik aktiviteler, agonistler veya inhibitörlerin reseptörlere bağlanması ve diğerlerini içeren çeşitli biyokimyasal ölçümler için kullanılmıştır.

Biyokimyasal parametre olarak hücrede sentezlenen protein veya DNA izlenmesi kullanılabilir. Her birinin çalışma tipine bağımlı olarak avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Hücre sayısı ve DNA içeriği benzer ölçümlerdir. Bir hücrenin DNA içeriği S fazı süresince iki katına çıkar fakat hücre kültürleri asenkronize olduğundan, kültürde ölçülen her bir hücrenin DNA miktarı zaman ile sabit kalır. Her bir insan hücresi 7-10 pg DNA içerir ve bu değer HeLa gibi fazlaca aneuploid hücreler ile aynı görünür. Hücre sayısının ölçümü, bir cell counter ile yapıldığında DNA'dan daha kolay fakat daha az kesindir. Çünkü hücrelerin yeniden süspansiyon edilmesi ve dilüe edilmesi gerekir. Harici standartlar gerektiren çalışmalarda var olan doğrulukta, floresans boyalar kullanılarak az sayıda hücrede DNA ölçülebilir.

2.8.6. Deri Yaşlanması ve Anti-aging Araştırmalarında *in vitro* Modellerin Kullanılması

Cilt yaşlanmasına sebep olan bu etkileri azaltmak, düzeltmek veya önlemek için çeşitli uygulamalar denenmiştir. Çeşitli kozmetik ve kozmesötik preparatlar anti-aging yani cilt yaşlanmasını önleyici amaçlarla formüle edilmiştir. Son yıllarda, lipozomlar gibi modern terapötik sistemler ile hazırlanan anti-aging preparatların sayısı oldukça fazla artmıştır. Bu preparatlar, kontrollü salım, uzun etki ve daha iyi biyoyararlanım sağlamaları sebebiyle tercih

edilmektedir. Askorbik asit, E vitamini, beta karotenler ve biyoflavonoidler gibi antioksidan maddeler anti-aging preparatlarda önemli yer tutmaktadır (122).

Türkiye piyasasında, anti-aging amaçlı kullanılmak üzere formüle edilmiş, oral, topikal ve parenteral pek çok preparat bulunmaktadır. Bunlar, genellikle, kozmetik preparatlar kapsamında yer aldıklarından piyasaya sadece “Sağlık Bakanlığı”na bildirim yapılarak girmektedirler. Etkinlik ve toksisite çalışmaları, in vivo koşullarda gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmaların dizaynı ve gerçekleştirilmesinde etik unsurlar önem kazanmaktadır. Son yıllarda, bilim adamları, kozmetik ürünlerin etkinlik ve toksisite çalışmalarında kullanılmak üzere alternatif ex vivo yöntemlerin geliştirilmesine yönelmiştir. Hücre kültürü çalışmaları bu alternatiflerin başında gelmektedir (123).

Hücre kültürü çalışmaları, hızlı, spesifik ve etkin sonuçlar vermektedir. Günümüzde, klinik çalışmalarda uygulanmaya başlanan bu metotların özellikle kozmetik ürünlerde kullanılması henüz çok yenidir ve ülkemizde bu sektörlerde henüz kullanılmamaktadır (124,125).

Tüm bunlar göz önüne alınarak tez çalışmamızda, Türkiye piyasasında bulunan bazı anti-aging etkili kozmetik ürünlerde yardımcı hammadde olarak yer alan şeftali çekirdeği yağının tek başına bir kozmetik formülasyonda kullanıldığında yeterli anti-aging etkisi gösterip göstermeyeceğinin in vitro, in vivo ve ex vivo (hücre kültürü) koşullarda incelenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, krem tipi yarı katı preparatlar hazırlanmıştır.

2.9. Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar

Deriye uygulanan yarı katı preparatlar arasında önemli bir yeri olan merhemler, etkin madde ve taşıyıcı (sıvağ, vehicie) kısımlarından oluşur (22).Merhem içinde etkin madde çözülmüş halde veya süspansiyon/katı halde bulunabilir. Merhem sıvağı tek fazlı olabileceği gibi, emülsiyon halinde de olabilir. Etkin maddenin çözünürlük problemi varsa, daha fazla çözüldüğü fazda çözülerek emülsiyon şeklinde bir merhem sıvağı içinde de hastaya sunulabilir (23).

2.9.1. Merhem:

Deri üzerine sürülmek üzere hazırlanmış, haricen kullanılan yarı katı preparatlardır, S/Y emülsiyonu olanları da vardır ve yağ oranı yüksektir (% 70). Sürülebilir ve yumuşaktırlar, uygulandıkları zaman erimeleri gerekmez. Terapötik etkili merhemlerin deriyi yumuşatıcı ve koruyucu özellikleri de vardır ve bunlara ilaveten terapötik etkiye sahip etkin maddeler içerirler. Derine nüfuz etme yetenekleri vardır. Deri gözeneklerini tıkamazlar (24,25).

Pomat, aslında Fransızca merhem demektir. Yağlı sıvağ ile hazırlanmış preparatıdır. Karakteristik kokuları vardır. Terapötik etkili olanlar etkin madde içerirler.

2.9.2. Krem:

Krem terimi genellikle yumuşak ve emülsiyon tipinde kozmetik preparatlar için kullanılır. Dış fazı sudur (Y/S) tipinde preparatıdır. S/Y tipinde olanları da vardır, ancak yağ oranı merhemden daha azdır. Preparatın pH'sı belirleyici olmamakla beraber, deri pH'sınadaha yakın, yani hafif asidiktir. Farmasötik kremler haricen uygulanmak üzere hazırlanmış emülsiyon şeklindeki preparatıdır; süspansiyon olanlar da vardır ve etkin madde içerirler. Krem ifadesi emülsiyon şeklindeki taşıyıcılara özgü bir terimdir.

2.9.3. Losyon:

Akışkan ve hidrofilik özelliği olan Y/S emülsyonlardır. Preparatın pH'sı belirleyici olmamakla beraber yaklaşık altı dolaylarındadır. Yağimsı ve yapışkan olduğu halde deride tutunma özelliğine sahiptir. Deri üzerinde oluşturduğu film tabakası gözle görünmez, salgıların çıkmasını engellemez ve kolaylıkla yıkanabilir (24,25).

2.9.4. Sera:

Yüksek oranda mum ihtiva eden preparatıdır. Merhemler gibi deriye sürülmek üzere hazırlanırlar. İçerdikleri fazla mum nedeni ile deri üzerinde erimezler, bu nedenle daha ziyade

koruyucu amaçla doğrudan veya bir bez üzerine sürülmüş olarak tatbik edilirler. Genellikle astrenjan ve stimülan maddeler için sıvağ olarak kullanılırlar (24,25).

2.9.5. Pasta:

Bünyelerinde % 50-70 oranında çözünmemiş katı madde içerirler. Koyu kıvamlı merhemlerdir. İçerdikleri toz maddeler nedeni ile hafif kurutucu etkileri vardır. Bu şekildeki bir taşıyıcı içine konulmuş etkin madde daha geç absorbe olur. Genellikle astrenjan ve antiseptik maddeler için sıvağ olarak seçilirler. Patların sıvağları çoğunlukla yağlı hidrokarbon sıvağlarıdır, ancak pektin, kitre zamkı, jelatin, nişasta gibi suda çözünebilen müsilaj maddeler de olabilir.(24).

2.9.6. Merhem Sıvağları

Sıvağ merhemini ya da yarı katı preparatın taşıyıcı kısmıdır. İdeal bir merhem sıvağının taşınması gereken özellikler şöyle sıralanabilir (24).

- 1- Deriye veya sürüldüğü bölgeye zararlı etkileri olmamalıdır,
- 2- Stabil olmalı ve kullanım süresince bozunmamalıdır,
- 3- Göze uygulanan veya koruyucu merhemler hariç penetrasyon kabiliyeti fazla olmalıdır,
- 4- Su tutma yeteneği olmalıdır,
- 5- Etkin maddeyi uygulama sonrasında kolayca salmalıdır,
- 6- Koruyucu merhemler ve güneşten koruyucu ürünler hariç, kolay yıkanabilir olmalıdır,
- 7- Etkin madde ile geçimli olmalıdır,
- 8- Ucuz olmalıdır.

Göz merhemlerinde bunlara ilaveten steril olması zararlı boyutta iri partikül içermemesi, (zoum) yumuşatıcı etkisinin olması, oluşturduğu film tabakasının gözü rahatsız etmeyecek boyutta olması, uygun viskozlukta ve gözyaşı ile karışabilir olması gibi özelliklerinin de olması istenir (25).

2.9.7. Merhem sıvağlarının sınıflandırılması:

Merhem sıvağları şu şekilde sınıflandırılabilir (25,26).

1-Hidrokarbon sıvağları,

2-Absorpsiyon sıvağları:

a-Anhidr olup su tutabilen sıvağlar,

b-S/Y tipi emülsiyon sıvağları,

3-Su ile yıkanabilen sıvağlar,

4-Suda çözünebilen sıvağlar.

2.9.7.1. Hidrokarbon sıvağları

Bunlara yağlı sıvağlar da denilebilir. Su içermezler ve kolaylıkla su tutamazlar. Suda çözünemediklerinden, deri üzerinden kolaylıkla uzaklaştırılmazlar. Deri üzerinde örtücü bir tabaka teşkil ederler. Bu amaçla en çok vazelin kullanılır. *Vazelin* (parafin) petrolden elde edilir. İyot, fosfor, fenol ve kükürdü çözebilir. Alkolde az, organik çözücülerde çok çözünür. Lanolin veya setil alkol ilavesi ile su tutma özelliği kazanır. *Plastibase 5* kısım polietilen ve 95 kısım sıvı parafin karışımından oluşmuş patentli bir sıvağdır. *Katı parafin*, merhem sıvağları na kütle ve kıvam verici olarak ilave edilir. *Domuz yağı* (Adeps Suillus, Axonge Lard) ise domuzun böbrek üstü bezlerinin etrafındaki yağlardan elde edilir. Az su tutma özelliği vardır. Kolay bozular. *Jelene* ise, Amerikan patentli madeni yağlar ile yüksek molekül ağırlığına sahip yağların birleştirilmesinden oluşan bir sıvağdır. *Ceresin* (yer mumu) beyazımsı-sarı renkli ve yarı katı bir sıvağdır. Küçük zincirli hidrokarbon karışımından oluşmuştur. Balmumu, cetaceum (balık nefsi), karnauba mumu, hayvansal ve bitkisel kaynaklı trigliseritler, hidrojenlenmiş pamuk, yer fıstığı yağı ve hint yağı ve silikonlarda bu gruptandır (23).

2.9.7.2. Absorpsiyon sıvağları:

Su tutabilen sıvağlardır. Eczacılıkta ve kozmetikte çokkullanılırlar. Antiseptik ilaçlar bu sıvağlardan daha fazla Oran da deriye geçebilirler. Deriyi yumuşatıcı (emolyan- emoflient) etkileri vardır. Genellikle S/Y emülsiyonu oluştururlar. İki gurupta incelenirler (23).

2.9.7.3 Anhidr olup su tutabilen sıvağlar:

2.9.7.3.1. Susuz lanolin:

Koyun yününden (yapağıdan) elde edilir. Açık sarı renkte, merhem kıvamında, suda erimeyen ve ağırlığının iki katı kadar suyu kıvamını kaybetmeden tutabilen bir sıvağdır. Diğer sıvağlara su tutma yeteneğini artırmak için ilave edilebilir. Su tutma Özelliği, yapısında bulunan setil ve lauril alkol gibi alifatik ve triterpenik alkollerden, kolesterol ve türevlerinden ileri gelir (23).

2.9.7.3.2. Hidrofil Vazelin:

Lanolin kadar su tutabilen, ancak koku ve kıvam açısından daha uygun olan ve iritan olmayan bir merhem sıvağı geliştirme çalışmaları sonucu elde edilmiş bir karışımdır. % 3 kolesterol, % 3 stearyl alkol, % 8 beyaz balmumu ve % 86 beyaz vazelin karışımından ibarettir. S/Y emülsiyonu oluşturur (23).

2.9.7.4. S/Y Tipinde Emülsiyon Oluşturabilen Sıvağlar:

Bunlar kendileri S/Y tipinde emülsiyon halindedir ve daha fazla suyu tutabilirler. Lanolin, Kold krem örnek olarak verilebilir. Lanolin % 20-25 oranında su içerecek şekilde hazırlanmıştır. % 65 susuz lanolin, % 20 su ve %, 15 sıvı parafin yada % 75 susuz lanolin ve % 25 su içeren karışım olarak kullanılır. Kold Krem ise, TK'ne göre % 7 beyaz balmumu, % 8 balık nefsi, % 60 badem yağı ve % 25 su içerecek şekilde hazırlanır. Kold Krem beyaz balmumu ve balık nefsinin su banyosunda (70°C) eritilip, badem yağının ilave edilerek ve karıştırılarak. hazırlanan yağ fazının aynı sıcaklıktaki suyla karıştırılıp soğutulmasıyla elde edilir. Burada emülgatör olarak görev yapan balmumu ve balık nefsidir. USP-24 ve NF-19de

yer alan Kold Krem formülleri ise, boraks içerir ve burada borakstaki sodyum ile balmumu ve balık nefsindeki yağ asitleri sodyum tuzu teşkil ederek emülgatör oluştururlar. Bu, hazırlama esnasında oluşur (23).

2.9.7.5. Suyla Yıkanabilen Sıvağlar:

Genellikle Y/S tipi emülsyonlardır. Dış fazı su olan kremler de bu gruptandır⁸⁴. Yapılarında su bulunur ve daha fazla da su tutabilirler. Suda çözünme özellikleri yoktur; ancak dış fazlarında su olduğu için kolaylıkla yıkanabilirler. Dış fazdaki su nedeniyle mikrobiyolojik bulaşmaya daha açıktırlar. Ayrıca bu su, uçabilir. Hidrofil Merhem en iyi örnektir (23).

2.9.7.6. Suda Çözünen Sıvağlar:

Bunlar yağsız merhem sıvağları olarak da bilinirler. Yapılarında su bulundurmazlar, fakat suda çözünme veya su ile ytkanabilme özellikleri vardır. Deri üzerindeki örtücü etkileri S/Y tipi emülsiyon olanlardan daha azdır. Bu gruba en iyi örnek polietilen glikol merhemidir. PEG (Polietilenglikol) merhemi % 40 PEG 4000 ve % 60 PEG400 karışımıdır. Ayrıca kitre, pektin, aljinatlar, nişasta, metil selüloz ve karboksimetil selüloz ile hazırlanan jeller de bu guruba dahildirler (23).

2.9.8. Merhemlerin Kullanım Amacına veya Farmakolojik Etkilerine Göre Sınıflandırılması:

2.9.8.1. Keratolitik Etkili Eerhemler:

Bunlar derinin boynuzsu tabakasını yumuşatmak veya yok etmek için kullanılan merhemlerdir⁸⁴. Bu merhemlerde salisilik asit (% 4-10), rezorsin (% 2-4), ihtiyol (% 10-20) ve kükürt (% 4-10) kullanılır. Trikloro asetik asit oldukça kuvvetli keratolitik etkiye sahiptir (23).

2.9.8.2. Keratoplastik Etkili Merhemler:

Derinin koruyucu tabakasının kalınlığını artırmak için kullanılan merhemlerdir. Salisilik asit %1-2 oranında keratoplastik etki göstermektedir (23).

2.9.8.3. Antiseptik Merhemler:

Mikroorganizma veya mantar enfeksiyonlarına karşı kullanılan merhemlerdir. Antibiyotiklerden tetrasiklin (% 1-3), neomisin (% 0.5-5), kloramfenikol (% 1-3); antifungallerden ise undesilenik asit ve tuzları (% 5-20), benzoik asit, salisilik asit, kükürt, civa amonyum klorür, griseofulvin, natamisin ve mikonazol kullanılmaktadır (23).

2.9.8.4. Antipüriritik Merhemler:

Bunlar kaşıntı gidermek amacıyla hazırlanmışlardır. % 0.25 mentol, % 0.5 fenol, % 2 kafur içeren merhemler bu amaçla hazırlanabilir (23).

2.9.8.5. Lokal Anestezik Etkili Merhemler:

Bunlar derinin belli bir bölgesindeki akut acıyı azaltmak için kullanılır⁷². Bu amaçla benzokain (% 1-20), lidokain (% 2-5) gibi maddeler kullanılır (23).

2.9.8.6. Lokal Analjezik Etkili Merhemler:

Bunlar haricen antiromatizmal ve antienflamatuvar etkili maddeleri içeren ve lokal etki göstermesi için hazırlanmış merhemlerdir. Kapsikum (% 2-4), metil veya etil salisilat (% 5-10) veya % 1-4 oranında naproksen, etofenam, diklofenak gibi antienflamatuvar etkili maddeler içeren merhem veya yarı katı preparat şeklinde hazırlanmış preparatlar vardır.

2.9.8.7. Yumuşatıcı/Nemlendirici Özelliği Olan Merhemler:

Bunlar deri yüzeyini yumuşatarak derinin normal esnekliğini sağlayan merhemlerdir. Deriyi, yüzeyini kaplayarak bir film tabakası oluşturmak ve nem kaybına engel olmayı amaçlayan yumuşatan merhemlerdir. Aslında bu, sıvıların özelliğinden ileri gelir. Yağlı maddelerden örneğin silikon, vazelin ve lanolinin bu şekilde etkileri de vardır. Gliserinin de deri üzerine uygulandığında yumuşatıcı ve nemlendirici özelliği vardır (23).

2.9.8.8. Koruyucu Merhemler:

Bunlar derinin üzerinde daha uzun süre kalabilen maddeleri (silikon ve türevleri, vazelin, çinko oksit, nişasta gibi) içeren yarı katı preparatlarıdır. Derinin üzerinde uzun süre kalabilirler ve deriyi hava, nem, kimyasal maddeler ve çözücülerden, bunları kendi bünyelerine almak sureti ile veya koruyucu tabaka oluşturmak yoluyla korurlar⁸⁴. Deriyi ışığın zararlı etkilerinden koruyan güneş kremleri veya UV filtreleri de bünyelerinde güneş ışığını absorbe edebilen homosilat, sinoksat, metil antranilat, oktil metoksi sinamat, oktokriolen ve avobenzon gibi maddeleri değişik oranlarda içeren sistemlerdir. Bu maddelerin formüldeki oranı, ürünün değişik ışıktan koruma faktörüne sahip olmasını sağlar. Ancak bunlar genellikle kolay sürülebilmeleri için viskoziteleri daha az ve akıcı sıvı şeklinde hazırlanırlar (23).

2.9.8.9. Sistemik Etkili Merhemler:

Bunlar deriye veya mukozaya uygulandıklarında sistemik etkiye sahip olabilen merhemlerdir. Kortizon, nitrogliserin ve östrojen gibi maddeler çok az miktarlarda bile kana geçse farmakolojik etkiye sahip olabilen maddeler olduklarından, uygulandıklarında sistemik etki oluşturabilirler (23).

2.9.9. Merhem Sıvağından Etkin Maddenin Salmına Etki Eden Faktörler:

Merhemlerin uygulandıklarında, istenen etkiyi gösterebilmeleri için, öncelikle etkin maddelerin sıvağdan salınması gerekir. Sıvağın ve etkin maddenin özellikleri buna etki eder. Ayrıca uygulanan bölgenin özellikleri de göz önünde tutulmalıdır. Bu nedenle perkütan emilime etki eden faktörler (23,27).

- 1- Etkin maddeye ait faktörler,
- 2- Sıvağa ait faktörler,
- 3- Uygulanan bölgeye veya bireye ait faktörler olmak üzere üç grupta incelenebilir.

2.9.9.1. Sıvağa Ait Faktörler:

2.9.9.1.1. Sıvağın Cinsi ve Özellikleri:

Etkin maddenin yağ/su partiyon katsayısı ile sıvağın yağ/su partiyon katsayısı önemlidir. Eğer sıvağ, etkin maddenin yağ/su partiyon katsayısı göz önüne alındığında, etkin maddenin çokfazla içinde bulunmak İsteyeceği özellikte seçilirse, etkin madde sıvağı kolay terk etmek istemeyecektir. Etkin maddenin deriye olan ilgisinin sıvağa olan ilgisinden fazla olması istenir. Ancak sıvağ, kolay ve hızla penetre olma özelliğine sahipse, birlikte etkin maddeyi de sürükleyerek onun da deriden geçişini hızlandırabilir. Etkin madde her ne kadar yağda çözünürlüğü arttıkça daha fazla deriden geçebiliyorsa da, etkin maddenin suda da bir miktar çözünürlüğünün olması gerekir (25,28).

2.9.10. Örnek Formülasyonlar

2.9.10.1. Kold Krem Formülasyonu

Genellikle s/y tipi emülsiyon şeklindedir. Bu tür emülsiyonlar, yüksek oranda yağ düşük oranda su içerirler. Cilt üzerinde parlak yağlı bir his bıraktığından; kuru ciltler için daha uygundur. Kold krem iyi bir yüz temizleme özelliğine sahiptir. Bunun yanında masaj kremi ve yumuşatıcı krem olarak da kullanılır (29,30).

Çizelge 2.5. s/y tipi kold krem formülasyonu örneği 1 (31)

Maddeler	%
Balmumu	10
Sıvı parafin	50
Sorbitan seskioleat	1
Lanolin	3,1
Boraks	0,7
Koruyucu	Ym
Parfüm	Ym
Distile su	34,5

Çizelge 2.6. s/y tipi kold krem formülasyonu örneği 2.(32)

Maddeler	g
Balık nefsi	12,5
Beyaz bal mumu	12
Badem yağı	56
Boraks	0,5
Gül suyu	5
Gül yağı	0,02
Distile su	14

2.9.10.2. Hidrofilik Krem Formülasyonu:

Hidrofilik krem; kold kremdeki gibi yüksek oranda yağ, düşük oranda su içermesine rağmen y/s tipi bir kremdir. Bundan dolayı cilt üzerinde yağlılık ve yapışkanlık hissi bırakmaz.

Çizelge 2.7. Hidrofilik merhem (U.S.P) (32)

Maddeler	%
Beyaz vazelin	25
Stearil alkol	25
Propilen glikol	12
Sodyum lauril sulfat	1
Propil paraben	0,25
Metil paraben	0,15
Su	37

2.10. Nemlendiriciler

Nemlendirici ürünler, haricen uygulanan ve formülasyonlarında istenen etkinin elde edilmesi için farklı bileşenlere yer verilen topikal preparatlardır (33). Nemlendirici terimi ise; deriyi yumuşatmak için tasarlanmış maddeleri ifade eder. Nemlendiriciler, derinin hidrasyonunu arttırarak bariyer özelliğini onaran ve deri yüzeyine dokunarak daha düzgün ve göze daha pürüzsüz görünmesini sağlayan ürünlerdir.(34,35)

Nemlendiricilerin yapı ve fonksiyonları karmaşık olup, birçoğu ilaç ya da kozmetik olarak adlandırılmaya eşit uzaklıktadır.

Deriyi nemlendirme etkisi olan ürünlere; krem, merhem, losyon, banyo yağları vb. örnek olarak verebiliriz. (36).

2.10.1. Nemlendiricilerin Kullanım Amacı

Nemlendirici maddelerin kullanım amacı; kuru cildi önlemek ve sağlıklı deriyi muhafaza etmektir (37).Nemlendiriciler, deriyi yumuşatır ve nemlendirirler. Derinin nem

içeriğini iyileştirir ve deri yüzeyinde koruyucu bir tabaka oluşturarak nemin derinin üst katmanlarında kalmasına yardımcı olurlar (38)

Nemlendiriciler cildi nemlendirirken iki yöntem kullanırlar (39). Bunlar;

- Suyun ciltten doğal olarak uçmasını sınırlamak
- Çevreden cilde su çekmektir

Nemlendiriciler kozmetik kullanımlarının yanı sıra; atopik egzama, sedef hastalığı, inflamatuvar dermatoz ve benzeri deri hastalıklarında terapötik olarak kullanılmaktadır (34).

2.10.2. Nemlendiricilerin Sınıflandırılması

Esas görevi cildi nemlendirmek olan nemlendiriciler, etki mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar (37,39). Bunlar;

1. Oklüzifler (örtücüler)
2. Hümektanlar
3. Emoliyanlar
4. Protein Yenileyiciler

2.10.2.1. Öklüzifler (Örtücüler)

Öklüzif nemlendirici maddeler genellikle yağlı maddelerdir. Deri üzerinde yağlı bir film tabakası oluşturarak deri üzerinden gerçekleşen su kaybının önlenmesine yardımcı olurlar (40,41).

Stratum cornemu kaplayıp kapatarak trans epidermal sıvı kaybını (Tesk) azaltan öklüzifler, yıkandıktan sonra nemli deriye hemen uygulandıklarında daha etkindirler. Sadece öklüzifler ile tesk %40 kadar azaltılabildiğinden ideal nemlendiricilerde öklüziflerle hümektanlar birlikte kullanılır (34).

Sık kullanılan öklüziflere; vazelin, parafin, squalen, lanolin, balmumu, mumlar, yağ alkolleri, badem yağı, susam yağı, soya yağı örnek olarak verilebilir.

2.10.2.2. Hümektanlar

Hümektanlar, yağ içermeyen higroskopik maddelerdir. Stratum corneuma penetre olabilen ve burada yüksek oranda su bağlayan suda çözünen maddelerdir. Atmosferdeki nem oranı fazla olduğunda ortamdan su çekerek, çevre nemi az olduğunda ise epidermis ve dermisten su çekerek stratum corneumun nemlendirilmesini sağlarlar (42,43).Hümektan özellikteki maddelere örnek olarak; gliserol, propilen glikol, sorbitol, pantenol, laktik asit ve laktatlar, alfa hidroksi asitler ve doğal nemlendirici faktör (DNF) içeriğinde bulunan maddeler verilebilir.

Doğal nemlendirici maddeler stratum corneumun bileşiminin yaklaşık %20-25 ini oluşturur. Bunlar; suda çözünebilir; hücre membran lipitleriyle çevrili olan ve suyu tutabilen maddelerdir. Doğal nemlendirici faktör miktarında azalma olursa deri kurumaya başlar (44,45).

Çizelge 2.8. Straum corneum'da bulunan DNF (Doğal Nemlendirici Faktör)'nin bileşimi (46).

Maddeler	%
Aminoasitler	40
Pirolidon karboksilik asit (PCA)	12
Sodyum veya Potasyum laktat	2
Üre	7
Sitrat	0,5
NH ₃ , Ürik asit, Glukozamin, Kreatin	1.5
N, Ca, K, Mg, Cl ⁻ , PO ₄ ⁻³	18,5
Şekerler, organik asitler, peptitler	8,5

2.10.2.3. Emoliyanlar

Suyun varlığında jel oluşturan, deriyi kayganlaştıran, yumuşatıcı maddelerdir. Deriyi yumuşaklık sağlarlar ve suyun buharlaşmasına karşı deride bir örtü oluştururlar. Böylece deriyi hem dış etkenlere karşı korur, hemde deride doğal bir parlaklık sağlarlar (46)

Emoliyanlara örnek olarak; hyaluronik asit ve tuzları, glikozaminoglikanlar, kitosanı örnek olarak verebiliriz.

2.10.2.4. Protein Yenileyiciler

Bunlar cildi örtücü özelliği olan hidrofob maddelerdir. Hücreler arasına girerek cilt nemini düzenleyici etkinlikleri vardır. Stratum Corneumdan geçise katkıda bulunarak, stratum corneumun su tutma özelliğini ikiye katlarlar (47)

Protein yenileyicilere; fosfolipitler, seramitler, doymamış yağ asitleri (linoleik ve α -linoleik asitleri) örnek olarak verebiliriz.

2.11. Şeftali

(*Prunus persica*), gülgiller (Rosaceae) familyasından bir yaz meyvesi. Dünyaya Çin'den yayıldığı düşünülen şeftali, uzun yaşam ve ölümsüzlük sembolüdür. Bol sulu ve tatlıdır.

Ilıman iklimi seven bir bitkidir. Genellikle 30 yıl yaşar. Türkiye'de en çok Bursa ve Akdeniz bölgelerinde tarımı yapılır. Meyvesi taze tüketildiği gibi suyu çıkarılarak meyve suyu yapılır. Bu meyvenin ekonomik değeri yüksek olup çok tüketilmektedir. Ağaç boyu genellikle 2 ve 2,5 metre olup yaz mevsiminde meyve verirler. Dona karşı dayanıksızdır.

Şeftalinin içinin geniş kullanım alanının dışında çekirdeği de yakıt olarak kullanılabilir. Çok sayıda olan ve ağacı örten yaprakları, sapında 2-5 adet balozu bezi bulunan kenarları dişli, yeşil renkli ve ok ucu biçimlidir. İlbaharda erkenden ve yaprağından önce açan pembe renkli çiçekleri yabancı güle benzer. Çeşitlerine göre Haziran'dan Eylül ayına kadar olgunlaşan şeftali meyvelerinin pek çok çeşidi (Türkiye'de yaklaşık 64 çeşit) vardır.

Şeftali çekirdeği, kabuğu yakıt olarak kullanılabilir. Şeftali çekirdeğinin kabuğu yakacak olarak kül oranı az ve kükürt oranı düşük bir temiz enerji kaynağıdır. Fırınlarda, seralarda, hamamlarda, kalorifer sistemlerinde, tavuk çiftliklerinde kullanılabilen alternatif bir enerji kaynağıdır. Şeftali çekirdeği gibi ürünler biyokütle olarak adlandırılan sıvı ve gaz yakıtların dışında tutulan yenilenebilir bir enerji kaynağı olarak küresel ısınma, kirlilik, doğal kaynakların azalması gibi sebeplerden dolayı tavsiye edilmektedir (48).

Şeftali ve gibi meyvelerin atıklarının genel olarak değerlendirme alanı fermantasyon teknolojisidir. Yumusak çekirdekli pektin ve tüketilebilir selüloz üretiminde de kullanılır.

Şeftali çekirdeğinin gıda maddesi olarak kullanılmamasının nedeni, bünyesinde "amigdalın" adlı zehirli bir glikozidin bulunmasıdır Şeftali çekirdeği bileşeni (49).

Analizler	Oran (%)
Nem	4.72
Protein	23.86
Yağ	38.88
Selüloz	18.60
Kül	3.74
Azotsuz ekstrakt	14.94

2.11.1. Şeftali Çekirdeği Yağı:

Şeftali işleme sanayi artıkları olan şeftali çekirdekleri; oleik ve linoleik asitlerin yüksek konsantrasyon özellikleri nedeniyle terapötik anlamda oldukça önemlidir. Şeftali bademi

antioksidan bileşikler olan oleik ve linoleik yağ asitleri bakımından zengindir. Şeftali çekirdeği yağı yüksek oleik asit içeriği (% 55-77) ve yüksek yağ asidi içeriği nedeniyle önemli tedavi edici özelliklere sahiptir. Bu nedenle, besin değeri de yüksektir (50). Oleik asit, bir 18-karbon tekli doymamış yağ asidi'dir. Trigliseridleri, LDL kolesterol, total kolesterol ve glisemik indeksi azaltmaya yardımcı olduğu için insan beslenmesinde önemlidir. Ayrıca, bitkisel yağların oksidasyon stabilitesindeki artış, oleik asit kaynaklıdır (51). Temel yağ asitleri, insanın büyümesi için gereklidir. Linoleik asit, omega-3 yağasitleri grubundadır. LDL ve total kolesterol düzeylerini azaltmasının yanı sıra insan sinir sistemi ve psikolojik fonksiyonlarının bakımı ve gelişimi açısından çok önemlidir.

İlk defa 1929 yılında Burr ve arkadaşları lipid ihtiva etmeyen suni bir diyetle beslenen ratlarda büyüme hızında azalış, deri ve üriner sistem lezyonları ve üreme noksanlığı gibi semptomlar gözlediler. Daha sonraki çalışmalar bu noksanlık belirtilerinin diyetle linoleik, alfa-linolenik ve arachidonik asitlerin eklenmesiyle iyileştiğini gösterdi. Esansiyel yağ asiti eksikliğinin ratlarda daha başka tanı koydurucu özellikleri kepekli deri, kuyrukta halka şeklinde nekroz, üriner sistem ve böbreklerde hemorajik kanamalardır. Fakat bu durum öldürücü değildir (52).

Epidermis derinin en yüzeysel tabakasıdır. Bu tabaka deriye yüzey örtüsü, nem sağlaması ve deri rengine katkıda bulunması nedeni fonksiyonel ve kozmetik açıdan büyük önem taşımaktadır. Epidermis yüzeyi eğer kuru ve kaba ise deri yaşlı görünmektedir. İyi nemlenmiş bir epidermis daha yumuşak ve parlaktır. Epidermiste doğal nemlendirici özelliğe sahip aminoasitler, lipitler bulunur. Yaş, genetik özellikler, mevsimsel değişiklikler, lipitten yoksun diyetle beslenme bu durumu etkiler. Linoleik asitten fakir diyet, kolesterol düşürücü ilaç kullanmak, temizleyici sabunların sık kullanılması kuru deriye yol açmaktadır (53).

Şeftali Çekirdeği Yağı, özellikle olgun ciltlerde pürüzsüzleştirici etkisi olan, hipoalerjik bir yağdır. Ciltte, bilinen yağ duygusunu bırakmaz. Bu özelliği nedeniyle hassas alerjik ciltlerde rahatlıkla kullanılabilir.

Çizelge 2.9. Şeftali çekirdeği yağının içeriği (54).

100 gr'da	
Yağ Asidi Profili (%)*	
C _{16:0} Palmitik asit	9.0
C _{18:0} Stearik asit	3.0
C _{16:1} Palmitoleik asit	1.0
C _{18:1} Oleik asit	29.0
C _{18:2} Linoleik asit	47.0
C _{18:3} Linolenik asit	9.0
Toplam Tokoferol (mg)	0.0
Toplam Karoten (mg b-karoten)	0.1
Toplam Fenolik (mg Gallik As.)	3.7
Antioksidan Kapasite (mmol Troloks)	0.1

Nemlendirici özelliğindedir. Yüksek oranda yağ asidi oranı ve içerisinde bulunan A, B ve E vitamini sayesinde çok besleyicidir. Kolay emilir, cildi temizler, gözenekleri tıkamaz, cildi yağlı bırakmaz. Bu niteliği nedeniyle de “yağ gibi olmayan yağ” olarak adlandırılır.

Dahili kullanılması halinde kabızlığın giderilmesinde, bağırsak solucanlarının düşürülmesinde, yoğun idrar söktürücü özelliğiyle idrar yollarının temizlenmesinde, hemoroit memelerinden doğan şikayetlerin giderilmesinde yardımcı olabileceği gibi safra kesesi ve böbrekler için de faydalı olduğu ifade edilmektedir. İçerisinde bulunan vitaminleri nedeniyle antioksidan özelliklere de sahip bulunmaktadır (55).

İleri yaşlarda derinin canlılığını yitirdiği, pürüzlerin oluştuğu bir gerçektir. Bir çok ürün bu yaşlarda deri tarafından emilememekte, beslenemeyen deride pürüzler gözle algılanabilir hale gelmektedir. Şeftali Çekirdeği Yağı kolayca ve hızla olgun ciltler tarafından da emilerek

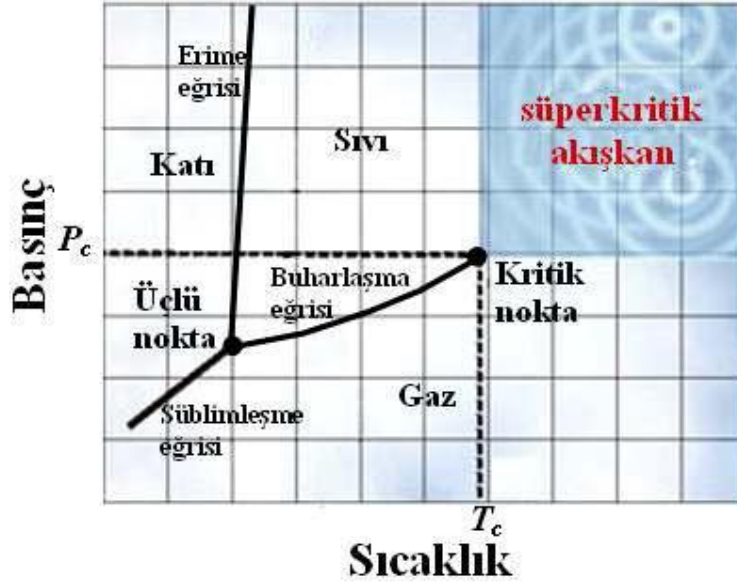
cildin yenilenmesi, canlanması ve pürüzsüzleşmesini sağlamaktadır (56). Bu nedenle, yabancı firmalar tarafından hazırlanan ve ülkemiz piyasasında da yer alan bazı anti-aging ürünlerin formülasyonunda yardımcı aktif madde olarak bulunmaktadır.

2.13. Süperkritik Karbondioksit (SC-CO₂) Ekstraksiyonu Yöntemi

2.12.1. Süperkritik Akışkan Nedir?

Maddeler katı, sıvı ve gaz hallerde bulunmaktadır. Ancak gazlar kritik sıcaklıklarının üzerinde ısıtılır ve basınç uygulanırsa süper kritik faz adı verilen dördüncü bir faza geçerler. Bir maddenin kritik sıcaklığı (T_c), o sıcaklığın üzerinde ne kadar basınç uygulanırsa uygulansın sıvılaştırılamayacağı maksimum sıcaklıktır. Bu sıcaklıktaki basınç da kritik basınçtır (P_c). Sıvı ve gaz evrelerin aynı özellikleri aldığı noktaya “**kritik nokta**”, bu nokta üzerindeki bölge de “**Süperkritik bölge**” adını alır (57).

Her maddenin bir Kritik Sıcaklığı (T_c), ve Kritik Basıncı (P_c) vardır. Madenin kritik sıcaklığı ve basıncı, gaz ve sıvı fazlarının bir arada bulunabildiği en yüksek sıcaklık ve basınçtır. Bilindiği gibi maddeler katı sıvı ve gaz olmak üzere üç fazda bulunurlar. Ancak madde, kritik sıcaklık ve kritik basıncın üzerindeki koşullarda süperkritik akışkan olarak adlandırılan dördüncü bir faza geçmektedir. Saf maddeler için basınç sıcaklık diyagramında süperkritik bölge aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (58).



Şekil 2.11. Saf bir maddenin basınç-sıcaklık diyagramı (57).

Üçlü nokta ile kritik nokta arasında kalan bölgede madde sıvı, buhar basıncı hattının altında kalan kısımda gaz, süblimleşme ve yoğunlaşma hattının üzerinde kalan kısımda ise katıdır (57).

2.12.2. Süperkritik Akışkanların Özellikleri:

Süperkritik akışkanların sıvı –gaz arası özellikleri vardır. Sıvıya benzer yoğunlukları olup sıvı bir çözücü gibi davranırlar. Düşük viskozite ve kütle transfer özelliği veren iyi difüzyon özelliklerine sahiptirler.

Yüksek bağıl yoğunlukları iyi bir çözücü özelliği kazandırır. Süperkritik akışkanın yoğunluğu, sıcaklık ve basınca bağlıdır. Belli bir basınçta sıcaklık artırıldığında veya belli bir sıcaklıkta basınç azaltıldığında yoğunluk azalır. Bu özellikten yararlanılarak ekstraktların fraksiyonlanması mümkün olmaktadır. Bir süperkritik akışkanın çözme gücü yoğunluğuna ve çözünen ile arasındaki kimyasal ilgiye bağlıdır. Kritik noktada çözme gücü en düşük değerdedir.

Buharlaşma gizli ısı sıfır, bu nedenle ısı kapasitesi çok yüksektir. Sistemin enerji gereksinimi azdır. Yüzey gerilim katsayıları ve viskoziteleri düşüktür ve bu nedenle pompalama masrafları düşüktür (57).

Çizelge 2.10. Sıvı, gaz ve süperkritik akışkanların özellikleri (57).

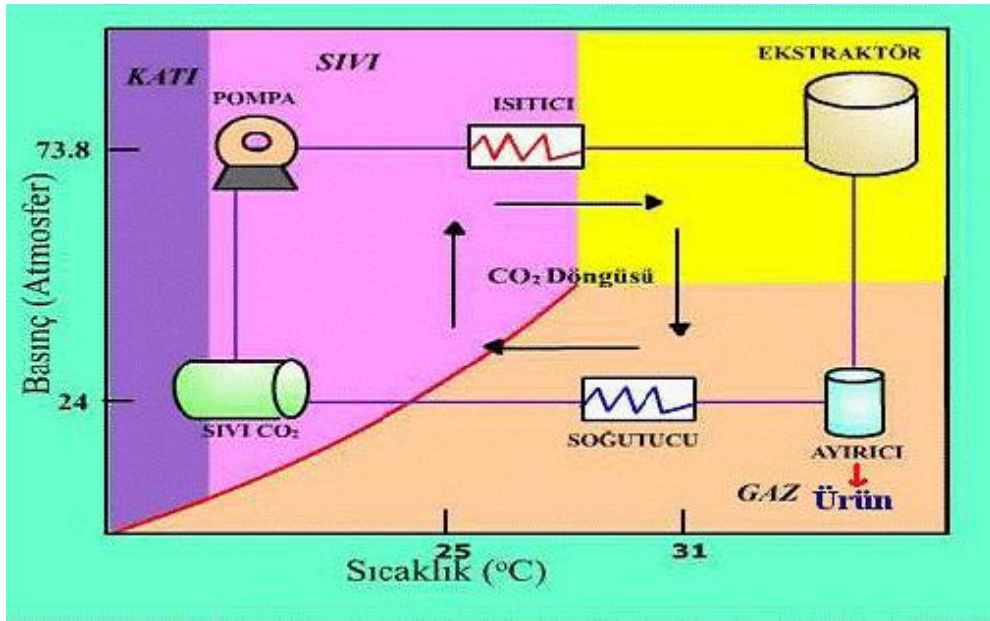
ÖZELLİK	SIVI	SÜPERKRİTİK AKIŞKAN	GAZ
YOĞUNLUK (kg.m ⁻³)	600-1600	200-1000	1
VİSKOZİTE (kg.(m.s) ⁻¹)	1.0x10 ⁻³	1.0x10 ⁻⁴	1.0x10 ⁻⁵
YAYINIRLIK (m ² .s ⁻¹)	1.0x10 ⁻⁹	1.0x10 ⁻⁷	1.0x10 ⁻⁴

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu , içerdiği pek çok avantaj nedeniyle geleneksel sıvı solvent ekstraksiyonuna bir alternatif olarak değerlendirilmekte ve tüm dünyada bu konu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde biyoteknoloji, besin ve ilaç endüstrisinde kullanılan sıvı solventlerin çoğunun tehlikeli yapısı, pahalılığı, olumsuz çevre etkileri göz önüne alındığında, bu solventler yerine özellikle karbondioksitin süperkritik akışkan formunun kullanımı önem kazanmıştır (59).

2.12.3. Süperkritik Karbondioksit

Karbondioksit,aseton, toluen, metanol,amonyak gıda endüstrisinde sıklıkla kullanılan süperkritik akışkanlardır. Bunlar içinde karbondioksit bir süperkritik akışkanda aranan bütün

özellikleri taşıdığı için gıda endüstrisinde kullanımı gittikçe yaygınlaşmaktadır. Kritik sıcaklığı 31°C ve kritik basıncı 7,38 MPa'dır. Ayrıca inerttir. Kuru ortamda korrozif değildir. Yanıcı ve patlayıcı değildir. Gıdaya ve çevreye zarar vermez. Basınç düşürüldüğünde karbondioksit gaz halinde kolaylıkla çözünenen ayrılır. Ekstraksiyon basınç ve sıcaklıklarında yapılacak küçük artış veya düşüşler, çözücünün viskozite ve yoğunluk gibi fiziksel özelliklerini kolayca değiştirdiği için çözücünün seçiciliği artar. Çok yönlü kullanılabilir. Hem katı, hem de sıvı sistemler için uygundur. Kütle transfer kapasitesi yüksektir. Gıda endüstrisinde kullanılan çözücüler toksik olmamalı, istenmeyen kalıntılar bırakmamalıdır. Aynı zamanda patlayıcı olmamalı, ucuz olmalı, kolaylıkla gıdadan ayrılabilmelidir. Karbondioksit bu özellikleri taşımaktadır (57).



Şekil 2.12. Süperkritik karbondioksit ile ekstraksiyon karbondioksit döngüsü.

2.12.4. Kısaca Karbondioksitin Özellikleri Şöyle Özetlenebilir:

Faz dengesi:

- ✓ Pek çok organik madde için iyi bir çözügendir.
- ✓ Organik maddelere göre bağıl uçuculuğu daha fazladır.

Taşınmı özellikleri

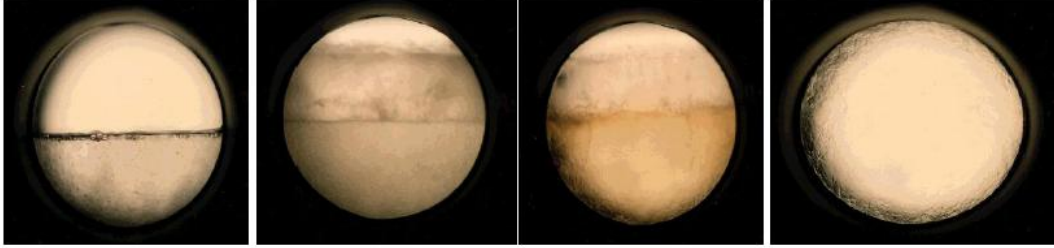
- ✓ Viskozitesi ve yüzey gerilim katsayısı düşüktür.
- ✓ Buharlaşma entalpisi çok düşüktür.

Güvenlik

- ✓ Toksik ve korozif değildir.
- ✓ Tutuşma özeliği yoktur.

Ekonomik özellikleri

- ✓ Maliyeti düşüktür.
- ✓ Kolay elde edilebilir.



Şekil 2.13. Karbondioksitin süperkritik forma dönüşümü. (57)

2.13. Çalışmanın Amacı

Bir sanayi atığı olan şeftali çekirdeğinin geri dönüşümünün sağlanması ülke ekonomisi açısından önem arz etmektedir. Bu nedenle, şeftali çekirdeği yağı elde edilip değişik alanlarda kullanılmaktadır. Bunlar arasında, kozmetik endüstrisindeki kullanımı pek yaygın olmamakla birlikte ümit vaad edicidir. Ülkemiz piyasasında mevcut birkaç kozmetik ürünün yapısından başka doğal ve sentetik etkili aktiflerle birlikte kullanılan yabancı menşeyli ürün mevcuttur. Ancak, süper kritik karbondioksit yöntemiyle elde edilmiş şeftali çekirdeğinin tek başına aktif madde olarak kullanıldığı anti-aging ürün mevcut değildir. Bu tez çalışmasında, farklı bir yöntem olan süper kritik karbondioksit ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen şeftali çekirdeği yağından kozmetik ürün hazırlanarak bu ürünlerin cildin sebum ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisi incelenerek tek başına kullanıldığında anti-aging etkisinin olup olmayacağını tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereç

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Balık Nefsi (Doğa ilaç, TR)
- Beyaz Balmumu (Egaş, TR)
- Badem Yağı (Egaş, TR)
- Boraks (Egaş, TR)
- Gül Suyu (Gülşah Kozmetik, TR)
- Stearil Alkol (Doğa İlaç, TR)
- Beyaz Vazelin (Egaş, TR)
- Gliserin (Doğa ilaç, TR)
- Sodyum Lauril Sülfat (SLS) (Doğa ilaç, TR)
- Sodyum Benzoat (Aklar Kimya, TR)
- Şeftali çekirdeği yağı (Doğal Destek A.Ş TABİA, TR)
- Tween 80 (Merck, ALMANYA)
- Kanlı agar (OR-BAK, TR)
- Tryptic Soy Broth (Merck, Almanya)
- 1-Butanol (Riedel de Haen 24124) (Seelze, Almanya)
- Amonyum Sülfat (Sigma A2939) (St Louis, A.B.D.)
- Asetik Asit (Merck 1.00056.2500) (New Jersey, A.B.D.)
- Bakır Klorür (Aldrich 222011) (St Louis, A.B.D.)
- Bakır Sülfat (Merck 1.02792.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Bovine Serum Albumin (Sigma A2153) (St Louis, A.B.D.)
- Disodyum Hidrojen Fosfat (Merck 1.06586.0500) (New Jersey, A.B.D.)
- Distile su (Sigma W3500) (St Louis, A.B.D.)
- Dulbecco's Modification Eagles Medium (DMEM) (Sigma D5796) (St Louis, A.B.D.)
- Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck 1.16743.1000) (New Jersey, A.B.D.)

- Etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) (Merck 1.08421.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Etanol (Merck 1.00983.2500) (New Jersey, A.B.D.)
- Fetal Calf Serum (Sigma F2442) (St Louis, A.B.D.)
- Folin Ciocalteu's Fenol Reagent (Sigma F9252) (St Louis, A.B.D.)
- Hank's Balanced Salt Solüsyonu (HBSS) (Sigma H6648) (St Louis, A.B.D.)
- Hidrojen Peroksit (Merck 1.08600.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Ksantin (Sigma X0626) (St Louis, A.B.D.)
- Ksantin Oksidaz (Sigma X1875) (St Louis, A.B.D.)
- Metilen mavisi (Sigma-Aldrich M9140) (St Louis, A.B.D.)
- Minimal Essential Medium-Eagle- MEM (Sigma M2279) (St Louis, A.B.D.)
- Nitroblue Tetrazolium Klorür (Sigma N6876) (St Louis, A.B.D.)
- Phosphate Buffered Salin (PBS) (Sigma P5368) (St Louis, A.B.D.)
- Penicillin-Streptomycin solüsyonu (Sigma P4333) (St Louis, A.B.D.)
- Piridin (Riedel de Haen 16037) (Seelze, Almanya)
- Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck 1.04873.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Potasyum Sodyum Tartarat (Merck 1.08087.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Redükte L-Glutatyon (Sigma G4251) (St Louis, A.B.D.)
- Sodyum bikarbonat (Fluka 88208) (St Louis, A.B.D.)
- Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma L5750) (St Louis, A.B.D.)
- Sodyum Dihidrojen Fosfat (Sigma-Aldrich S9638) (St Louis, A.B.D.)
- Sodyum Hidroksit (Merck 1.06462.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Sodyum Karbonat (Merck 1.06392.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Sodyum Klorür (Merck 1.06404.1000) (New Jersey, A.B.D.)
- Tetrametoksipropan (Aldrich 10838) (St Louis, A.B.D.)
- Tiobarbitürik Asit (Sigma T5500) (St Louis, A.B.D.)
- Trikloroasetik Asit (Merck 1.00810.0250) (New Jersey, A.B.D.)
- Tripan Blue (Sigma T8154) (St Louis, A.B.D.)
- Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma T4049) (St Louis, A.B.D.)

Çalışmalarda Kullanılan Diğer Sarf Malzemeleri

- 12, 24 ve 96 kuyucuklu plakalar
- Balon joje (25-50-100-250-500-1000 mL)
- Beher (100-200-400-600 mL)
- Cam kalemi
- Cam pipeti (1-2-5-10 mL)
- Cryotüp
- Deney tüpü (Cam)
- Deney tüpü (Plastik)
- Enjektör (2-5-10 mL)
- Erlen-mayer (100-200-400-500-600 mL)
- Falkon tüpü (15-50 mL)
- Hücre kültürü flaskı (25 cm²)
- Kuru buz
- Lam
- Lamel
- Manyetik balık
- Manyetik balık tutucu
- Maske
- Mezür (50-100-500-1000 mL)
- Neubauer lamı
- Otoklavlanabilir 100 ve 250 ml cam şişe
- Yarı-otomatik pipet
- Parafilm
- Pastör pipeti (Cam)
- Pastör pipeti (Plastik)
- Piset
- Steril eldiven
- Steril pipet uçları (0,5-10, 2-20, 10-100 ve 200-1000µL'lik)

- Tek kullanımlık 0,22 µ çaplı milipor filtre
- Tüp fırçası
- Tüplük
- Vial

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Su banyosu (Bourgeat, Fransa)
- Elektronik terazi (Ohaus, Çin)
- Etüv (Binder, Almanya)
- Dikey Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Buzdolabı (Regal, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, Almanya)
- Sebumetre (Dermalab, Danimarka) (Nem ölçüm ataçmanı ile)
- Optik mikroskop (Nikon, Almanya)
- (-80 °C) derin dondurucu: Elcold (Danimarka)
- Buzdolabı: Regal, RBD 4602 NCF (Türkiye)
- Çeker Ocak: Biolab (Türkiye)
- Derin Dondurucu: Regal, RDD 1145 (Türkiye)
- Distile Su Cihazı: Millipore (Billerica, A.B.D.)
- Hassas Terazi: Mettler Toledo (Almanya)
- Homojenizatör: Ika- Ultra turrax (Almanya)
- Işık mikroskobu: Olympus (Astoria, New York, A.B.D.)
- İverted mikroskop: Euromex (Hollanda)
- Karbondioksit inkübatörü: Biolab (Türkiye)
- Laminar Akım Kabini: Polar (Türkiye)
- Mikropipet Seti: Gilson-Pipetman (Middleton, A.B.D.)
- Mikropipet Seti: Eppendorf (Almanya)
- Mini santrifüj: Eppendorf (Almanya)
- Otoklav: Nüve OT4060 (Türkiye)
- pH Metre: Mettler Toledo (Almanya)

- pH Metre: WTW pH 315i (Almanya)
- Soğutmalı Mikrosantrifuj: Sigma,2-16K (St. Louis, A.B.D.)
- Spektrofotometre: Analytikjena-SPECORD 50 (Almanya)
- Su Banyosu: Bourgeat (Fransa)
- Vizkozimetre: Fungi Lab Viscostar +L (İspanya)
- Vorteks: Heidolph REAX (Almanya)

3.1.3. Hücre Dizileri

Çalışmada TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nden temin edilen fare embriyonal fibroblast hücre dizileri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Şeftali Yağının Eldesi ve karakterizasyonu

Şeftali yağı, Doğal Destek Tic.A.Ş tesislerinde süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemi uygulanarak elde edilmiştir. Elde edilen yağ, organoleptik özellikler, pH, viskozite, saflık, kaynama derecesi, çözünürlük, stabilite, iritasyon açısından karakterize edilmiştir.

3.2.2. Formülasyon Çalışmaları

3.2.2.1. Deneyde Kullanılan Formülasyonların Belirlenmesi

Şeftali çekirdeği yağının cilt üzerindeki nemlendirme derecesini belirlemek için % 0, % 0,5, % 1, % 2, % 4, % 6 oranlarında şeftali çekirdeği yağı içeren kremlerin, su/yağ tipi cold krem ve yağ/su tipi hidrofilik krem formülasyonlarının hazırlanmasına karar verildi.

3.2.1.1.1. Deneyde Kullanılan Kold Krem Formülasyonu

Kold krem formülasyonunda aşağıda verilen kimyasal maddeler ve oranları kullanılmaya karar verildi.

Balık Nefsi	12,5 g
Beyaz Balmumu	12 g
Badem Yağı	56 g
Boraks	0,5 g
Gül Suyu	5 g
Sodyum Benzoat	0,25 g
Distile Su	14 g

Çizelge 3.1. % 0-6 şeftali çekirdeği yağı içeren kold krem formülasyonları

Formülasyonlar (g)	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Balık nefsi	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Beyaz Balmumu	12	12	12	12	12	12
Distile Su	56	56	56	56	56	56
Boraks	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Gül Suyu	5	5	5	5	5	5
Sodyum Benzoat	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Badem Yağı	14	14	14	14	14	14
Şeftali Çekirdeği Yağı (%)	0	0,5	1	2	4	6

3.2.1.1.1.1. % 0-6 Şeftali Çekirdeği Yağı İçeren Kold Krem Formülasyonlarının Hazırlanması

Badem yağı, balık nefsi ve beyaz balmumu istenen miktarlarda tartılarak porselen kapsüle alındı ve su banyosuna konularak maddeler eritildi. Boraks ve sodyum benzoat tartıldı ve mezürde gerekli miktarda hesaplanan su ile erlende karıştırıldı. Boraksın daha iyi

özünmesi için erlen su banyosuna konuldu. Havan su banyosuna konularak porselen kapsülle aynı sıcaklığa getirildi. Porselen kapsüldeki karışım havana alındı ve soğuyana kadar havan eli ile iyice karıştırıldı. Sonra erlendeki karışım porsiyonlar halinde havana eklendi ve iyice yedirildi. Oluşan emülsiyona ılıkken gül suyu eklendi. En son olarak saat camında tartılmış olan şeftali çekirdeği yağı havana eklendi ve iyice karıştırıldı. Oluşan krem temiz ve kuru pomat kutularına konup etiketlendi.

3.2.1.1.2. Deneyde Kullanılan Hidrofilik Krem Formülasyonu

Hidrofilik krem formülasyonunda aşağıda verilen kimyasal maddeler ve oranları kullanılmaya karar verildi.

Stearil Alkol	25 g
Beyaz Vazelin	25 g
Gliserin	12 g
Sodyum Lauril Sülfat	1 g
Sodyum Bezoat	0,25 g
Distile Su	37 g

Çizelge 3.2. % 0-6 şeftali çekirdeği yağı içeren hidrofilik krem formülasyonları

Formülasyonlar (g)	F7	F8	F9	F10	F11	F12
Distile Su	25	25	25	25	25	25
Beyaz Vazelin	25	25	25	25	25	25
Gliserin	12	12	12	12	12	12
Sodyum Lauril Sülfat	1	1	1	1	1	1
Sodyum Benzoat	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Stearil Alkol	37	37	37	37	37	37
Şeftali Çekirdeği Yağı (%)	0	0,5	1	2	4	6

3.2.1.1.2.1. % 0–6 Şeftali çekirdeği Yağı İçeren Hidrofilik Krem Formülasyonlarının Hazırlanması

Stearil alkol ve beyaz vazelin tartılarak porselen kapsüle kondu. Su banyosuna konularak maddelerin eritilmesi sağlandı. Sodyum benzoat, SLS ve gliserin istenen miktarlarda tartıldı ve erlen de gerekli miktarı hesaplanmış olan su ile karıştırıldı. Maddelerin suda çözünmesi sağlandı. Çözünmenin daha iyi olabilmesi için erlen su banyosuna kondu. Porselen kapsüldeki kütle kapsülle aynı sıcaklığa getirilmiş havana alınarak iyice karıştırıldı. Soğumaya doğru erlendeki sıvı faz azar azar eklendi. Son olarak istenen miktarda tartılmış olan KY havana eklendi ve homojen dağılım olabilmesi için iyice karıştırıldı. Oluşan krem temiz pomat kutularına alınıp etiketlendi.

3.2.2. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Çalışmalar

3.2.2.1. Kremlerin Doluamlarının Yapılacağı Kavanozların Sterilizasyonu Ve Kremlerin Doluamlarının Yapılması

Kremlerin içine konulacağı cam kavanozlar ve alüminyum kapaklar dikey otoklavda 1 atm basınç altında 121 °C'de 20 dakika boyunca sterilizasyona bırakıldı. Cam kavanozları otoklava koymadan önce alüminyum kapaklar üstüne tam kapatılmadı ve kağıtla sarılarak flasterle yapıştırıldı.

Tüm kremler kodlandırıldı ve laminar akım altında aseptik şartlarda eldiven takarak steril kavanozlara ve pomat kutularına dolduruldu. Stabilite çalışmaları için kremler 25 gramlık cam kavanozlara dolduruldu. Mikrobiyolojik stabilite çalışması, viskozite, pH ölçümü, emülsiyon tipinin belirlenmesi ve sağlıklı gönüllülerde kullanılmak için ise pomat kutularına kremlerin dolumu yapıldı.

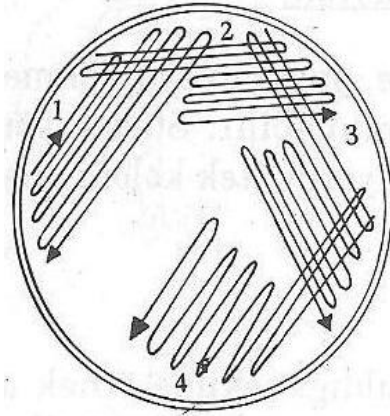
3.2.2.2. Formülasyonlarda Stabilite Çalışması

Kendi hazırladığımız kremler laminar akım altında steril edilmiş olan cam kavanozlara 25 gr olacak şekilde dolduruldu. Her bir kremden üçer adet cam kavanozlara dolduruldu.

Bunlardan biri +4 °C'de buzdolabına, biri 30 °C'de etüve, diğeri ise normal oda koşullarına konularak 6 ay sürecek olan hızlandırılmış stabilite çalışmasına tabi tutuldu. 6 ay sonunda kremlerde oluşacak tüm değişiklikler not edildi. Stabilite çalışması sonucunda tüm kremlerin pH ve viskozitesi ölçüldü, emülsiyon tiplerine bakıldı. Bu değerler stabilite çalışmasından önceki değerlerle karşılaştırılabilmek için not alındı.

3.2.2.3. Formülasyonlarda Mikrobiyolojik Stabilite Çalışması

Mueller-Hinton Broth 6 g tartıldı. Erlene alınarak üzeri 100 ml distile su ile tamamlanarak çözünmesi sağlandı. Çözünmenin daha iyi olabilmesi için erlen 5 dakika su banyosunda bekletildi ve sonrasında distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Daha sonra manyetik karıştırıcıda sıcaklık kapalıyken 1 N NaOH yardımıyla pH 7,3'e ayarlandı. Erlenin ağzı sargı beziyle rulo şeklinde kapatılarak otoklava sterilizasyon için götürüldü. 1 atm basınç altında 121 °C'de 20 dakikada sterile edilen tüplerin içerisine kodlandırılan krem numunelerinden birer gram konuldu. Üzerine Tween 80'den 0,5 ml ve 8,5 ml'de TSB konularak tüpler 10 ml'e tamamlandı. 45 °C'deki su banyosunda steril baget yardımıyla karıştırılarak tüplerdeki kremin en geç 30 dakikada çözündürülmesi sağlandı ve laminar akım altında kanlı agar besiyerlerine kremlerin ekimi şekil 3.1'e göre yapıldı. Ekimi yapılan besiyerleri 37 °C'deki etüve 24 saat süresince inkübasyon için bırakıldı. Süre sonunda herhangi bir mikrobiyolojik kontaminasyon olup olmadığına bakıldı.



Şekil 3.1. Petri kutusundaki agarlı besiyeri yüzeyine inokülasyon şekli

3.2.2.4. Kremlerde Yapılan Fiziksel İncelemeler

3.2.2.4.1. Kremlerin pH'sının Ölçülmesi

Pomat kutularına konulan kremlerin pH'sı pH metre kullanılarak ölçüldü. Herbir kremin ölçümünden sonra pH metrenin elektrodu iyice yıkanıp temizlenmiştir. Yeniden kalibrasyon işlemi yapıлып, diğer kremin ölçümüne geçilmiştir. Her formülasyon serisi için

ölçümler en az 3 kez tekrarlandı. Aritmetik ortalama değerleri alındı. Stabilite çalışmasından çıkan kremlerde aynı işlemler tekrar edilerek pH'daki tüm değişimler not alındı.

3.2.2.4.2. Kremlerin Viskozitesinin Ölçülmesi

Stabilite çalışması öncesi ve sonrası tüm kremlerin viskozitesi ise rotasyon tipi viskozimetre yardımıyla ve L4 numaralı uç kullanılarak ölçüldü. Bunun için; kremler küçük steril bir behere kondu ve her bir kremin viskozitesi oda sıcaklığında ölçüldü. İşlem, 5 kez tekrarlandı. Bu değerlerin ortalaması alındı. Oluşan değişikliklere bakılarak stabilite çalışmalarının viskozite üzerindeki etkileri incelendi.

3.2.2.4.3. Kremlerin Emülsiyon Tipinin Belirlenmesi

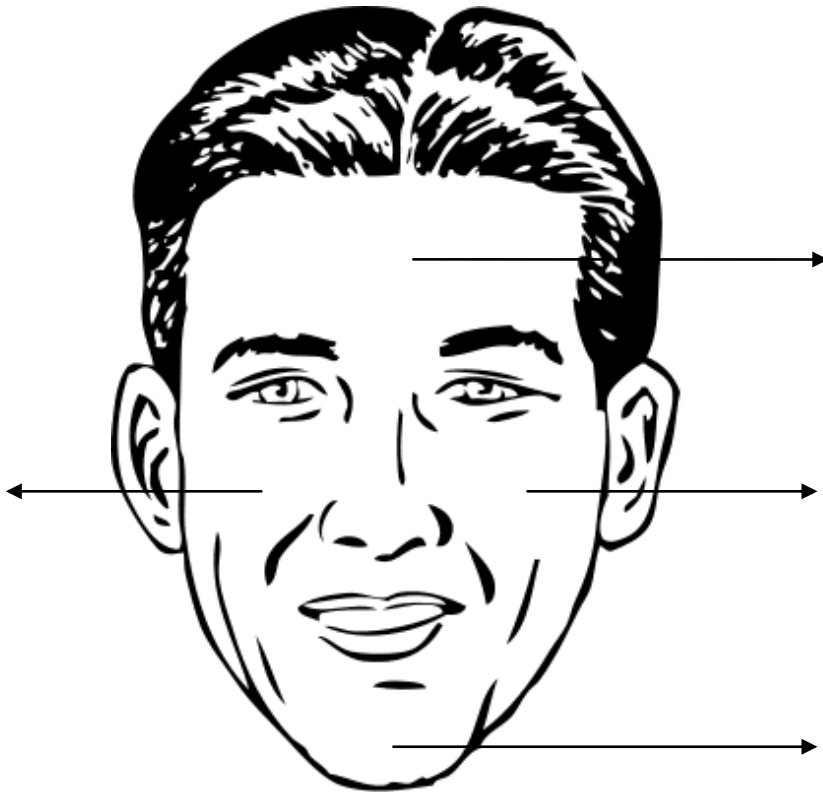
Kremlerin emülsiyon tipleri boya testi kullanılarak belirlendi. Önce bir miktar krem alınarak lam'ın üzerine kondu. Üzerine bir damla metilen mavisi damlatıldı. Spatül yardımıyla iyice karıştırıldı. Sonra mikroskopta formülasyonlar incelendi. Metilen mavisi suda çözünen bir boya olduğu için boyanın emülsiyonun tamamıyla karışıp karışmadığına veya sürekli fazda sabit kalıp kalmamasına bakılarak formülasyonların emülsiyon tipleri belirlendi.

3.2.2.5. Kremlerin Etkinlik ve Güvenlik Testleri

Sadece mikrobiyolojik stabilite çalışmalarından ve güvenlik testinden geçen formülasyonlar in vivo koşullarda gerçekleştirilen etkinlik testlerinde kullanıldı. Güvenlik testi için her bir gönüllünün kolunun iç kısmı kullanacağı krem numunelerinden sürüldü. Herhangi bir alerjik reaksiyonun olup olmadığına bakıldı. Kremlerin derinin sebum değeri üzerine etkilerini incelemek için 20'si bayan, 20'si erkek olmak üzere 40 sağlıklı gönüllü belirlendi. Bu gönüllülerden yirmisine %0, %2 ve %4 oranlarında şeftali çekirdeği yağı içeren hidrofilik, yirmisine de yine aynı oranlarda şeftali çekirdeği yağı içeren cold krem formülasyonları uygulandı. Deneklere kremleri nasıl kullanacakları ve nerelere kullanacakları Şekil 3.2'deki krem uygulama talimatı doğrultusunda anlatıldı.

3.2.2.5.1. Krem Uygulama Talimatı Formu

- 1 – Kremleri lütfen yatmadan önce sürünüz.
- 2 – Kremleri sürmeden önce mutlaka ellerinizi yıkayınız.
- 3 – Birinin uygulaması tamamlanmadan diğerini uygulamayınız.
- 4 – Mümkün olduğu kadar kremleri kullanırken aynı bölgeye herhangi bir kozmetik ürün (Özellikle nemlendirici) uygulamayınız.
- 5 – Kremleri her seferinde eşit miktarlarda alınız. (Yaklaşık bir mercimek tanesi büyüklüğünde) ve bir kibrit kutusu büyüklüğünde bir alana yayınız.
- 6 – Lütfen kremleri size söylenen bölgelere uygulayınız (Size verilen şemaya göre sürünüz).
- 7– Size verilen ürünlerden biten olursa haber veriniz.
- 8 – Herhangi bir alerjik durum gözlelediğinizde (kızarıklık, kaşıntı, kabarma, şişme v.b) uygulamayı kesiniz ve haber veriniz.
- 9 – Size verilen sürenin sonunda anket formunu doldurunuz.
- 10 –Danışmak veya bilgi almak istediğiniz bir şey olursa aşağıdaki numaraları arayabilirsiniz.



Şekil 3.2. Krem uygulama talimatı formu

3.2.2.5.2. Krem Uygulama Çalışması:

Denekler kremleri kullanmadan önce alın, çene, sağ yanak ve sol yanakların nem değerleri ölçüldü. Sonrasında deneklere kremlerden mercimek tanesi büyüklüğünde kullanıldı ve uygulamadan sonra 10 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 24 saat beklenip tekrardan kremlerin uygulandığı bölgelerin sebumetre yardımıyla sebum değerleri ölçüldü. Sonuçlar not alındı.

3.2.2.5.3. Sübjektif Değerlendirme

Sağlıklı gönüllülerden kremleri uyguladıktan sonra derinin yüzeyinde, düzgünlüğünde herhangi bir değişiklik olup olmadığına dair gözlemleri yazılı olarak istendi. Bunun için anket formu hazırlandı ve deneklerden kremleri kullandıktan sonra gözlemledikleri düzgünlük, parlaklık, yayılabilirlik vb. gözlemlerini belirtmeleri istendi.

3.2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.3.1. Hücre Kültürü için Sterilizasyon

Hücre kültüründe kullanılan tüm plastik malzemeler ve hazır haldeki steril medyumlar ticari firmalardan temin edilmiştir. Cam malzemeler, 160 °C’de 60-90 dak. otoklavlandı. Tüm sıvı maddeler 0.22 µm por büyüklüğündeki milipor filtrelerden süzülerek steril edildi. Steril kabin, 15 dak. ultraviyole ışık açılarak ve bunu takiben 15 dak. havalandırılarak çalışma öncesi steril edildi. Sterilize edilen kabine alınacak malzemeler ise %70 alkolle silinerek içeri alındı.

3.2.3.2. Hücre Kültürüne Uygulanacak Anti-aging Kremler için Yapılan Önlemler

Çalışmamızda kullanılan tüm krem formülasyonları taze hazırlanıp steril kaplara doldurulduktan sonra, ilk defa laminar akım kabini içerisinde açılmış ve pipet yardımıyla her

bir numuneden 1'er mL steril falkon tüplere alınmıştır. Falkon tüplerin içerisindeki kremlerin üzerine 9'ar mL DMEM eklenip iyice pipetaj yapıp karıştırılmış ve vortekslenmiştir. Krem formülasyonlarından alınan numunelerin iyice çözünmesi için 20 dak. ultrasonik su banyosunda tutulmuştur.

3.2.3.3. Hücre Dizileri ve Kültür Aşaması

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nden (MAM) kriyo-well içinde temin edilen fibroblast hücre dizileri rutin olarak, 100 ml besiyeri içinde, 10 ml Fetal Calf Serum, 4 mL 9.2 gr/mL sodyum bikarbonat çözeltisi, 1 ml Penisilin/Streptomisin solüsyonu destekli 10 ml 10x DMEM çözeltisi olacak şekilde % 5 karbondioksitli ortamda yetiştirildi. Fare fibroblast hücre dizisi, ilk alındığı gün, 37 °C karbondioksitli etüvde 24 saat süresince dinlendirmeye bırakıldı. Bir sonraki gün, kontaminasyon olup olmadığı kontrol edildi. 48 saat sonra flasttaki tüm besiyeri steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flastlara 37 °C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 mL eklendi. Flastlara eklenen Tripsin-EDTA steril pipet yardımıyla çekildi. Tripsini çekilen flastlara yine aynı miktarda Tripsin-EDTA eklendi. Flastlar 5-7 dak. boyunca 37 °C'de karbondioksitli etüvde bekletildi. Flast tabanına tutunmuş adherent hücrelerin birbirlerinden ayrılmaları invert mikroskop ile kontrol edildi. Kalkan hücreler, önceden hazırlanmış içinde 3 mL besiyeri bulunan steril santrifüj tüplerine steril pipet yardımıyla aktarıldı. 125 G santrifüj kuvvetinde oda ısısında 10-15 dak. santrifüj edildi. Üste kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücrelerle birlikte 0.5 mL sıvı steril pipet yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 mL besiyeri konmuş flastlara, hücrenin yoğunluk durumuna göre (2-4 flast) dağıtıldı.

3.2.3.4. Hücrelerin Deney için Hazırlanması

Hücreler, deney için flast içerisinde yeterli sayıya eriştiklerinde 1 mL tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Eklenen tripsin solüsyonu 1 dak. hücrelerin üzerinde gezdirildi ve flastlar inkübatörde 2 dak. bekletildi. İnkübasyon sonrası 5' er mL DMEM ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı. Hücre süspansiyonu 5 dak. santrifüjlendi (400Xg). Süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 6 kuyucuklu platalere uygun sayıda (5 x10⁵) hücre aktarıldı. Toplam besiyeri hacmi de 5 mL' ye tamamlandı. Kuyucuklara konulan fare embriyonik fibroblast hücreleri 37 °C'de %

5 CO₂ içeren ortamda 24 saat inkübe edilerek hücrelerin kuyucukların tabanına yapışması sağlandı. Bu sürenin sonunda, kuyucuklarda hazırlanan cold krem (CK1 ve CK2) ve hidrofilik krem (HK1 ve 2) formülasyonları ile negatif kontrol grubu olmak üzere 5 ayrı grup oluşturulmuştur. Her bir grup da hem 24 sa hem de 48 sa inkübasyonunu sağlayacak şekilde toplam 10 gruba ayrılmıştır. CK1, CK2, HK1 ve HK2 gruplarına 100'er µL hazırlanan her bir krem süspansiyonundan (10'ar µL numune içermektedir), negatif kontrol gruplarına ise 100'er µL DMEM eklenmiştir. Bu işlem hem 24 sa hem de 48 sa süre ile inkübe edilen hücrelere uygulanmıştır. Tüm gruplardaki uygulamalar 3'er paralel hücre serisi olacak şekilde tekrarlanmıştır. Bulunan sonuçların aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.3.5. Hücre Canlılığının Tespiti

24 ve 48 sa inkübasyon sürelerinin her birinin sonunda hücreler, 1:1 oranında hücre süspansiyonu: tripan mavisini boyası karışımı ile seyreltilerek Thoma lamında ve ışık mikroskobu altında sayıldılar. Tripan mavisini alan hücreler ölü olduğundan maviye boyanmış olarak görüldü. Mikroskop altında boyanmış ve boyanmamış hücrelerin sayımı ile sitotoksosite belirlenmiştir. Çıkan sayı dilüsyon faktörü olan 104 ile çarpılıp ölü ve canlı hücrelerin yüzde değerleri bulunmuştur.

Sitotoksosite oranı (ölü hücrelerin yüzdesi) = [(tripan mavisini alan hücreler / tüm hücreler) X 100] formülünden hesaplanmıştır.

3.2.3.6. Hücre Homojenizatının Hazırlanması

İnkübasyonun 24. saatinin sonunda platelerde bulunan hücrelerden 1 mL alınarak antioksidan aktivite ve lipid peroksidasyonunun ölçümü için kullanılmıştır. Kullanılan kimyasalların hücreler üzerindeki sitotoksitesini devam etmemesi için vakit geçirilmeden hücreler fosfat tamponuyla 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra, her örneğe 1 mL fosfat tamponu (pH:7,4) eklenerek teflon uçlu homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiş ve elde edilen homojenizat 13.000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant alınmış ve çalışma gününe kadar -20 °C'de saklanmıştır. 48. saatin sonunda da hücrelerden aynı şekilde 1 mL alınmış ve 24. saatin sonunda yapılan işlemler bu hücrelere de uygulanmıştır. Antioksidan aktivite ve lipid

peroksidasyonu çalışması her bir grup için 3 paralel hücre serisi olacak şekilde tekrarlanmıştır.

3.2.3.7. Hücre Kültüründe Biyokimyasal Ölçümler

Tüm gruplardaki fibroblast hücrelerinin oksidatif stres durumlarının belirlenebilmesi için antioksidan enzimlerin aktivitelerine ve lipid peroksidasyonuna bakılmıştır. Bu kapsamda, enzimatik antioksidan olarak katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerine ve lipid peroksidasyonunun belirlenebilmesi için malondialdehit (MDA) düzeyine bakılmıştır. Bulunan değerler protein düzeyleri ile oranlanarak “mg protein” olarak ifade edilmiştir.

3.2.3.7.1. Protein Ölçümü (Lowry Metodu)

Homojenizattaki protein düzeyinin ölçülmesi Lowry va ark. tarafından tarif edilen yöntemle göre yapılmıştır. Yöntemin prensibi, alkali çözeltide oluşan bakır-protein kompleksinin fosfomolibdat/fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi) redüklemesiyle oluşan koyu mavi rengin 750 nm de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (126). Her bir örnek için protein miktarı, bovine serum albumin (BSA) standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğriye göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplanmıştır. Hücre homojenizatındaki protein miktarı mg olarak hesaplanmıştır (127).

Deneyde Kullanılan Reaktifler:

A Reaktifi: 0,1 N NaOH çözeltisi kullanılarak %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi hazırlandı.

B1 Reaktifi: %1'lik CuSO₄.5H₂O çözeltisi hazırlandı.

B2 Reaktifi: %2'lik Na-K-Tartarat çözeltisi hazırlandı.

B Reaktifi: B1 ve B2 eşit hacimde karıştırıldı.

C Reaktifi: 50 mL B reaktifine 1mL A reaktifi eklendi. Reaktif taze hazırlandı ve bekletilmeden kullanıldı.

D Reaktifi: 1 mL Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi, 5 mL distile su ile karıştırıldı.

Protein standardı: 250 mg/100 mL bovin serum albümin (BSA) 20, 40, 80, 160, 320, 640 µg/mL protein içerecek şekilde dilüe edilerek çalışma standartları hazırlandı.

3.2.3.7.2. Katalaz aktivitesini ölçümü

Katalaz aktivitesi tayini Aebi tarafından tarif edilen yöntemle göre yapılmıştır. Yöntemin esası, H₂O₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkılmasının 240 nm’de izlenmesidir. Çalışmamızda katalaz aktivitesi U/mg protein olarak ifade edilmiştir (128).

3.2.3.7.3. SOD aktivitesinin ölçümü

SOD aktivitesi tayini Sun ve ark. tarafından tarif edilen yöntemle göre yapılmıştır. Oksidatif yolla enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik süperoksit radikallerinin suya ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran SOD enzim aktivitesinin ölçüm prensibi, ksantin varlığında ksantin oksidazın açığa çıkardığı süperoksit radikallerinin nitroblue tetrazolium (NBT) ile 560 nm’de absorblanan rengin ölçülmesine dayanır. Çalışmamızda homojenizatın SOD aktivitesi U/mg protein olarak ifade edilmiştir (129).

3.2.3.7.4. PON ve ARE aktiviteilerinin ölçümü

PON ve ARE aktiviteilerinin tayini Eckerson ve ark. tarafından tarif edilen yöntemle göre yapılmıştır. Paraoksonaz aktivite ölçümünde 2 mM CaCl₂ ve 4 mM paraokson ihtiva eden 100 mM Tris-HCl; pH 8,0 tamponu kullanılarak; paraoksonaz’ın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenol’ün 412 nm deki oluşumu ölçülerek, paraoksonaz aktiviteileri incelenmiştir. Arilesteraz aktivitesi ölçümleri için ise yine 2 mM CaCl₂ ihtiva eden 100 mM Tris-HCl; pH 8 tamponu kullanılarak; substrat olarak paraokson yerine son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde fenilasetat ilave edilmiştir ve arilesterazın enzimatik hidrolizi sonucu oluşan fenol 270 nm’de Analytikjena-SPECORD 50 UV/VIS spektrofotometresinde ölçülmüştür. Paraoksonaz aktivitesi için 1 ünite, 1 mikromol p-nitrofenol/mL serum/dk.; arilesteraz aktivitesi için 1 Unite, 1 mikromol fenol/mL serum/dk. olarak tanımlanmıştır (130).

3.2.3.7.5. MDA düzeyinin ölçümü

MDA düzeyinin ölçülmesi Yagi tarafından tarif edilen yönteme göre yapılmıştır. Deneyin prensibi poliansatüre yağ asidlerinin peroksidasyonu ile oluşan son ürünlerden biri olan MDA'nın sıcak ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu bileşiğin pembe-kırmızı renginin 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. 1,1,3,3-tetrametoksipropanı standart olarak kullanılarak yoğunluk-absorbans grafiği çizilmiştir. Regresyon analizi ile saptanan formül kullanılarak örneklerdeki MDA yoğunlukları hesaplanmıştır. Bulunan değerler homojenizattaki protein miktarı ile oranlanarak nmol/mg protein şeklinde ifade edilmiştir (131).

3.2.4. İstatistiksel yöntem

Analizler SPSS v.16.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. Veriler ortalama±standard sapma olarak ifade edilmiş ve istatistiksel anlamlılığın sınırı $p<0,05$ olarak belirlenmiştir. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığını test etmek için Kolmogorov-Smirnov testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar ANOVA ve alt grup karşılaştırmalarında LSD çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Şeftali Yağının Karakterizasyonu

Süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu ile elde edilmiş olan şeftali çekirdeği yağının kaynama derecesi $255 \pm 1.15^{\circ}\text{C}$ olarak bulunmuştur. Bu değer, literatürle uyumludur. Rölatif dansitesi ise, 0.91g/ml olarak tespit edilmiştir. 90° lik alkolde ve distile sudaki çözünürlükleri incelendiğinde; alkolde kolay çözünen, ancak, distile suda çözünmeyen bir yağ olarak tanımlanabilir. Güvenlik testlerinde 24 ve 48 saat sonrasında dahi deride dermatolojik açıdan önemli ölçüde eritem oluşturmadığından topikal kullanım için uygun olduğu belirlenmiştir. 15 adet sağlıklı gönüllüde yapılan güvenlik testlerinin sonucu aşağıda verilmiştir.

Çizelge 4.1. Şeftali çekirdeği yağı uygulanan sağlıklı gönüllülerde % eritem değişim değerleri (n = 15).

Gönüllü no	% eritem değişim değeri t= 24 sa	% eritem değişim değeri t = 48 sa
1	2.62	1.22
2	1.23	0.00
3	0.00	-0.89
4	4.76	1.94
5	-0.37	-2.01
6	0.00	-0.88
7	2.01	0.18
8	0.72	0.18
9	3.00	0.71
10	-0.73	1.43
11	0.00	0.91
12	1.10	-2.66
13	1.12	-0.01
14	0.00	0.40
15	0.53	0.41
	$\bar{x}_{\text{ort}} \pm \text{sd} = 1.12 \pm 0.48$	$\bar{X}_{\text{ort}} \pm \text{sd} = 0.012 \pm 0.42$

Şeftali çekirdeği yağının içeriği ise; aşağıda belirtildiği gibi tespit edilmiştir. Kimyasal içerik tayini, tez çalışmamıza destek veren ve yağın temin edildiği Doğal Destek Tic.A.Ş Firması tarafından gaz kromatografisi ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.2. Şeftali çekirdeği yağının kimyasal içeriği.

Kimyasal içerik	Miktarı
Palmitik asit	4-10 % (a/a)
Stearik asit	1-5 % (a/a)
Oleik asit	20-30 % (a/a)
Linoleik asit	40-50 % (a/a)
Linolenik asit	5-10 % (a/a)
Diğer yağ asitleri (Palmitoleik asit, elaidik asit)	≤ 2 % (a/a)
Doğal tokoferoller	190-210 % (a/a)
Sabunlaşma değeri	135-160
Asit değeri (mg KOH/g)	< 10
Peroksit değeri (meq/kg)	< 20
Iyot değeri (%)	90-100

Şeftali çekirdeği yağının yapılan mikrobiyolojik incelemelerde koliform (CFU/g) içermediği tespit edilmiştir. Total canlı bakteri miktarı ile maya ve küf miktarı ise, $\leq 10^2$ olarak bulunmuştur.

Yağın ağır metal içeriği Atomik Absorpsiyon yöntemiyle tespit edilmiş ve elde edilen değerler aşağıdaki çizelgede sunulmuştur. Bulunan değerler, Avrupa Farmakopesine uygunluk göstermektedir.

Çizelge 4.3. Şeftali çekirdeği yağının ağır metal içeriği.

Ağır metal	Miktarı (mg/l)
Kadmiyum	≤ 0.1
Cıva	≤ 0.1
Arsenik	≤ 0.1
Kurşun	≤ 0.1

Elde edilen şeftali çekirdeği yağının pestisit içeriğinin ise, < 0.01 mg/kg olduğu belirlenmiştir.

4.2. Kremlerin Hazırlanması

Bölüm 4.1’de elde edilen veriler ışığında kozmetik amaçlı olarak kullanımı uygun bulunan yağdan hareketle Bölüm 3.2.1.1.1 ile 3.2.1.1.2.1’de tarif edildiği üzere farklı konsantrasyonlarda şeftali çekirdeği yağı içeren cold krem ve hidrofilik krem formülasyonları hazırlanmıştır. Hidrofilik krem formülasyonlarının konsantrasyon arttıkça sürülebilirliğinin cold kreme göre daha az olduğu görülmüştür. Kremler, aseptik koşullarda steril cam kavanozlara doldurulmuştur. Organoleptik özellikleri incelendiğinde, beyaz renkli ve hoş kokulu oldukları tespit edilmiştir. Hazırlanan kremlerde fiziksel kontroller (pH, viskozite) yapılmıştır.

4.2.1. Kremlerin Fiziksel Özelliklerinin İncelenmesi

4.2.1.1. Kremlerin pH Değerlerinin Ölçümü

Hazırlanan krem formülasyonlarında yapılan ölçümlerde laboratuarda hazırladığımız kremlerin pH’larının literatüre uygun olduğuna karar verildi.

Laboratuarda hazırladığımız cold krem ve hidrofil krem tarzı formülasyonların stabilite çalışması öncesi ve sonrasında ölçülen pH değerleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Hazırlanan krem formülasyonlarının pH değerleri n=6, t= 180 gün.

pH	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0. GÜN	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	6-7	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
30. GÜN	6.1-7.2	7.3	7-8	7-8	7-8	7-8	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6	5-6
90. GÜN	6.2-7.4	7.1	7.4	7.3	7.6	7.4	5.3	5.3	5.6	5.4	5.2	5.6
180. GÜN	6.1-7.2	7.3	7.5	7.3	7.6	7.4	5.2	5.4	5.4	5.7	5.4	5.6

4.2.1.2. Kremlerin Ölçülen Viskozite Değerleri

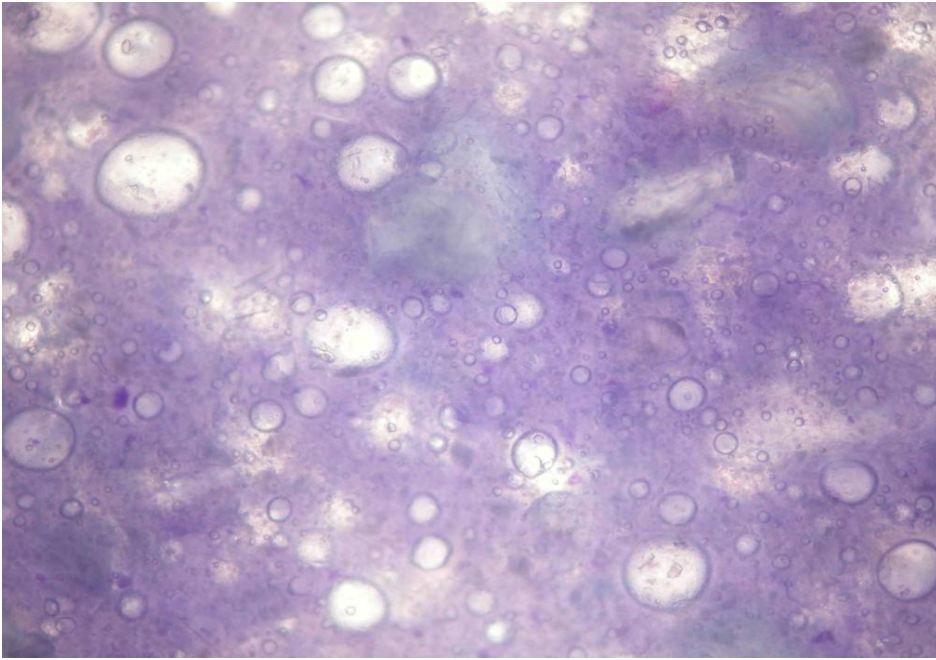
Şeftali yağı içeren kremlerin vizkozite ölçümleri Bölüm 3.2.2.5’te anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçların doğruluğundan emin olabilmek için her bir kremin vizkozitesi 5 sefer ölçüldü. Çıkan değerlerin ortalaması alındı. Laboratuarda hazırladığımız formülasyonun stabilite öncesi ve sonrasında elde edilen viskozite değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Hazırlanan kremlerin viskozite değerler (cps). N= 5, t= 180 gün.

Viskozite	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
0. GÜN	65743	65432	65323	64989	65345	65234	74432	74565	73987	74123	74345	74543
30. GÜN	17156	17143	17123	17098	17143	17113	17621	17645	17502	17524	17564	17531
90. GÜN	18234	18017	18125	17679	17567	17845	18123	18367	18673	18925	18562	18923
180. GÜN	18921	18223	18343	18234	18671	18673	18956	18234	18978	19012	19017	19234

4.3. Kremlerin Emülsiyon Tiplerinin İncelenmesi

Yaptığımız boya testi sonucunda laboratuarda hazırlanmış olduğumuz hidrofilik krem tipi formülasyonların sürekli fazlarının metilen mavisi ile boyandıkları görüldü. Hidrofilik krem formülasyonlarının dış fazlarının metilen mavisiyle boyanması, emülsiyon yapılarının y/s tipi olduklarını gösterdi (Şekil 4.1). Laboratuarda hazırladığımız kold krem formülasyonlarının ise dış fazlarının metilen mavisiyle boyanmadıklarını ve dolayısıyla emülsiyon tiplerinin s/y tipi emülsiyon oldukları belirlendi. Hızlandırılmış stabilite çalışmalarına konan tüm ürünlerde yapılan boya testi sonuçlarından formülasyonların emülsiyon tiplerinin değişmediği görüldü.



Şekil 4.1. Hidrofilik merhem tipi formülasyonların mikroskopik analizi.

4.4. Formülasyonlarda Mikrobiyolojik Stabilite Sonuçları

Çalışmada kullanılan krem formülasyonları Bölüm 3.2.2.3'te anlatıldığı gibi mikrobiyolojik açıdan incelendi. Mikrobiyolojik stabilite çalışmasına tabi tutulan kremlerden hiçbirinde mikroorganizma üremesi görülmedi.

4.5. Sebun Değerlerinin Ölçümüne Ait Bulgular

Bu Bölümde, laboratuarda hazırlanan formülasyonlardan bu kısımda CK2 olarak kodladığımız %2 oranında şeftali çekirdeği yağı içeren kold krem formülasyonu ile HK2 olarak kodladığımız %2 oranında yağ içeren hidrofilik krem formülasyonları uygun fizikokimyasal ve topikal uygulama özelliklerine sahip olduklarından kullanılmıştır. CK2 ve HK2 formülasyonlarının insanlar üzerinde yapılan etkinlik testleri sonucunda elde edilen sebun değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir. Sebun değerinde 24 saatte görülen artış açısından cinsiyetler arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir. Sebun değerlerindeki artışın piyasa preparatına oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Laboratuarda hazırlanan formülasyonların sebun değerleri üzerine 24 saatlik etkisi, piyasada mevcut olan anti-aging bir kremle kıyaslanmıştır. Piyasa preparatına ait veriler Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Piyasa preparatının sebun değerleri üzerine 24 saatlik etkisi (n= 8).

Sebun($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) Zaman	SG ₁	SG ₂	SG ₃	SG ₄	SG ₅	SG ₆	SG ₇	SG ₈
0 dk.	271.8	208.3	155.8	199.1	146.6	193.1	109.1	154.5
24 saat	260.9	293.3	187.1	213.8	184.6	231.1	120.1	172.3

Çizelge 4.7. Laboratuarda hazırlanan formülasyonlarının salon testlerinden elde edilen sebun değerleri ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$). (n = 10 bayan, n= 10 erkek).

Deney Grubu Sebun	HK2*	HK2**	HK2***	CK2****
0 dk.	312.9	204.3	761.9	434.6
24 saat	563.8	551.6	925.2	802.7

*HK2: Hidrofilik krem uygulanan 10 erkek gönüllüye ait veriler.

**HK2: Hidrofilik krem uygulanan 10 bayan gönüllüye ait veriler.

***CK2: Cold krem uygulanan 10 erkek gönüllüye ait veriler.

****CK2: Cold krem uygulanan 10 bayan gönüllüye ait veriler.

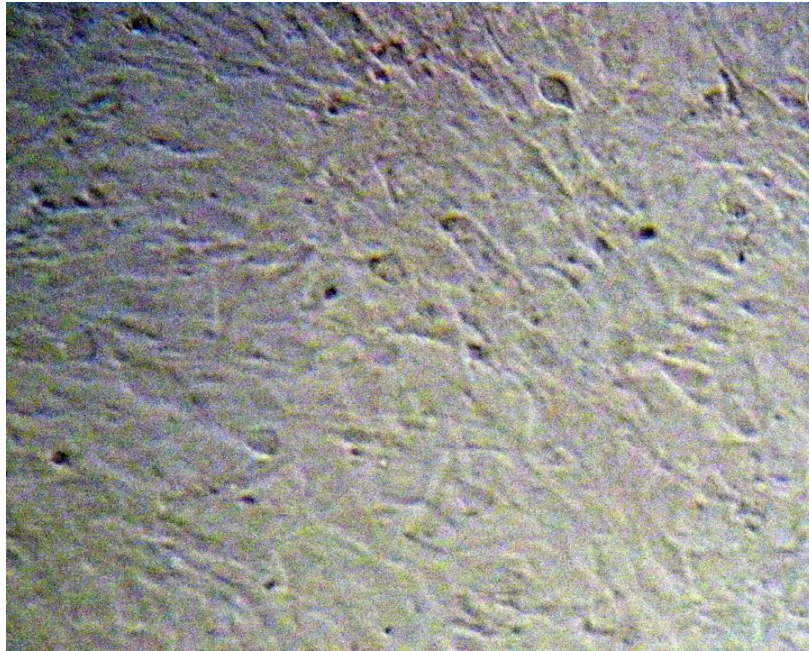
4.6. Güvenlik Testlerine Ait Bulgular

Hekim gözetiminde yapılan 24 ve 48 saatlik güvenlik testleri sonucunda laboratuvarımızda hazırlanan formülasyonların uygulandığı gönüllülerin hiçbirinde eriteme rastlanmamıştır.

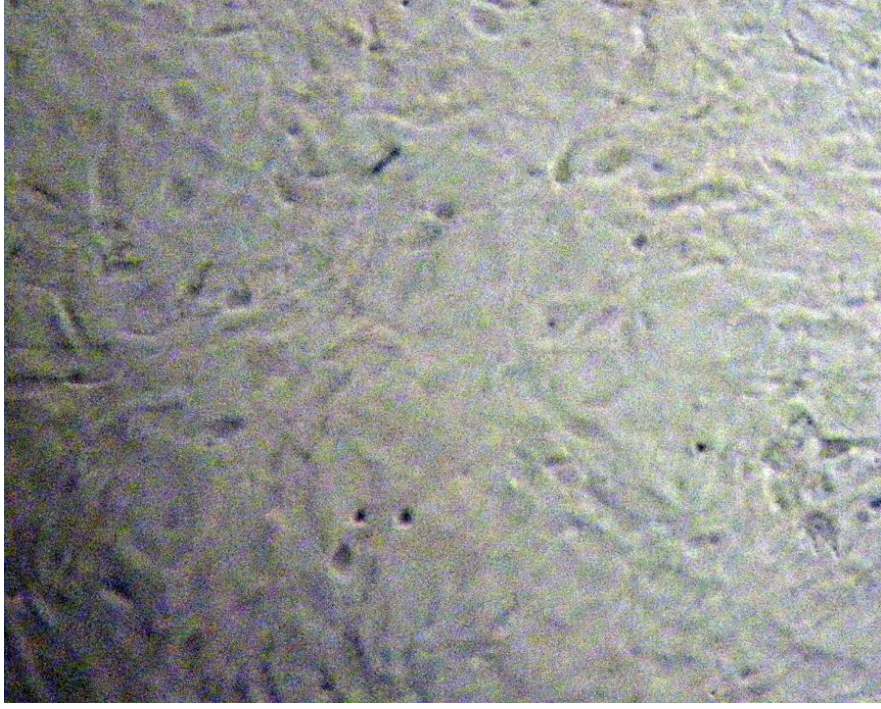
4.7. Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

4.7.1. Fibroblast Hücrelerinde Sağkalım Oranları

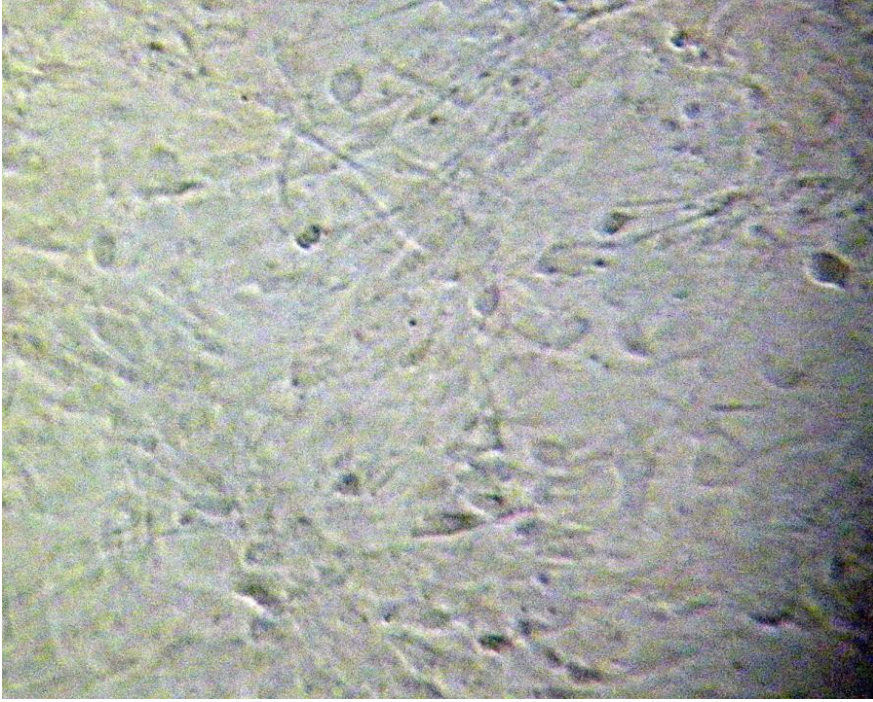
Yaptığımız çalışmada fare embriyonik fibroblast hücreleri, kültür ortamında 24 ve 48 saat boyunca 4 farklı krem formülasyonu (CK1 ve CK2; HK1 ve HK2) inkübasyona bırakılmışlardır. 24. ve 48. saatlerin sonunda kontrol grubu, CK1, CK2, HK1 ve HK2 gruplarındaki fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüleri Şekil 4.2-4.3'de verilmiştir.



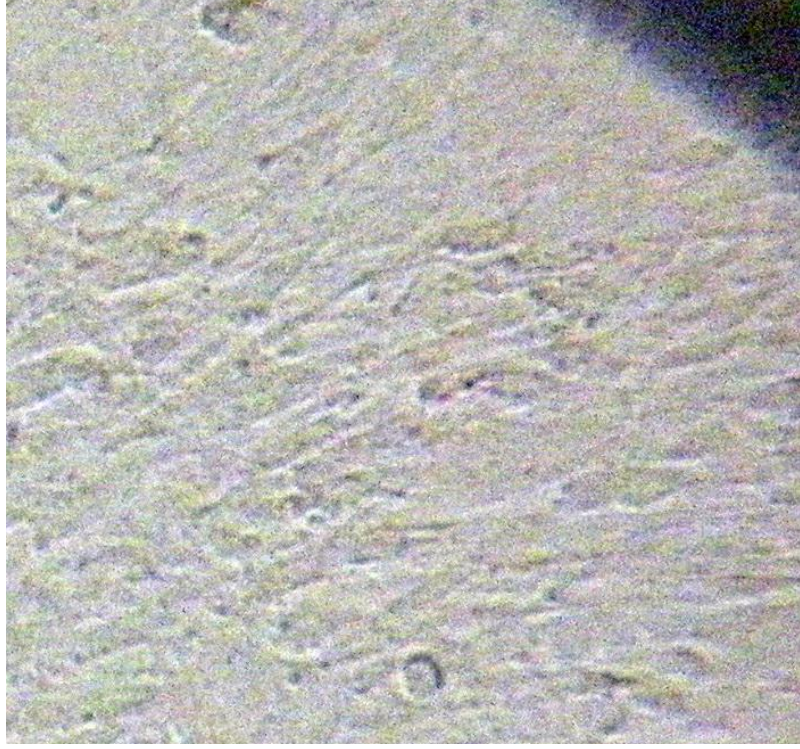
Şekil 4.2. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda CK2 formülasyonunun uygulandığı fibroblast hücrelerinin mikroskopik görünümü



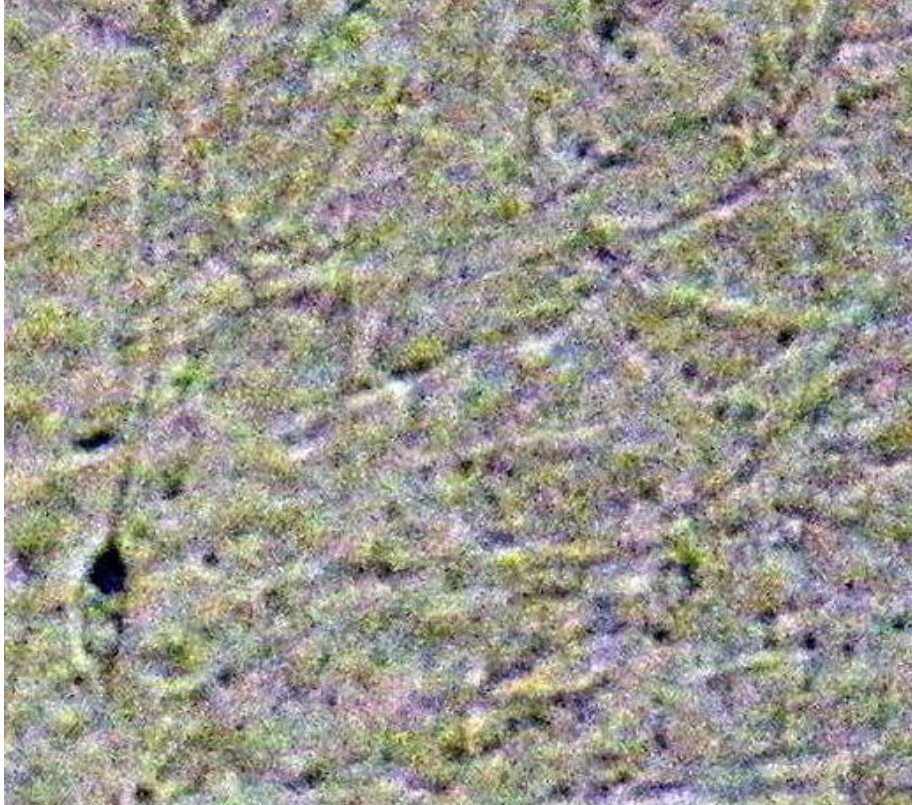
Şekil 4.3. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda HK2 formülasyonunun uygulandığı fibroblast hücrelerinin mikroskopik görünümü.



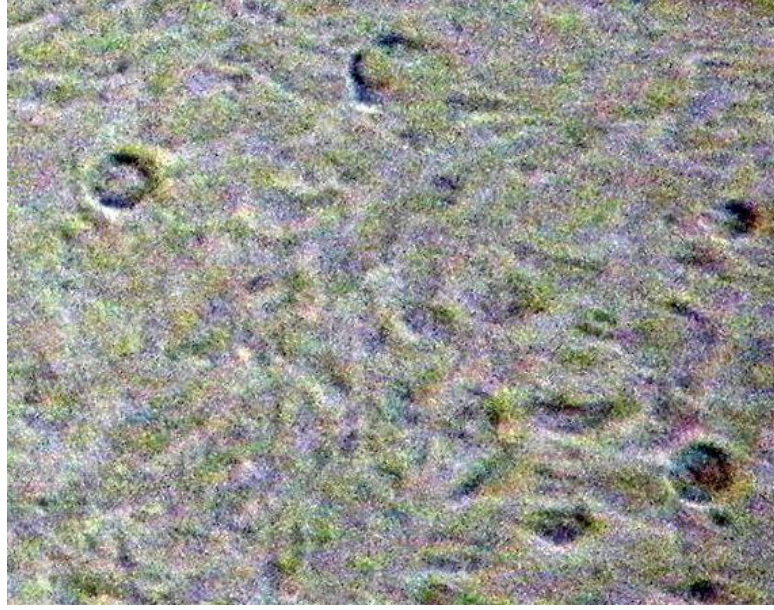
Şekil 4.4. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubundaki hücrelerin mikroskopik görünümü.



Şekil 4.5. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrol grubundaki hücrelerin mikroskopik görünümü.



Şekil 4.6. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda CK2 formülasyonunun uygulandığı fibroblast hücrelerinin mikroskopik görünümü



Şekil 4.7. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda HK2 uygulanan hücrelerin mikroskopik görünümü.

24. saatin sonunda kontrol grubunda, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde hücre canlılık oranları sırasıyla % 88.11±12.49, % 62.46±10.26, % 56.09±6.45, % 43.45±7.67 ve % 37.67±4.05 olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde canlılık oranları kontrol, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda sırasıyla % 84.53±10.41, % 58.76±5.05, % 67.29±7.54, % 36.16±6.44 ve % 26.34±4.21 olarak bulunmuştur. Krem uygulanan tüm gruplardaki hücre canlılık oranları kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde azalmıştır ($p<0,05$). 24. saatin sonunda hücre ölümünün en fazla olduğu grupların sırasıyla HK1, HK2, CK2 ve CK1 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinin olduğu tespit edilmiştir. 48. saatin sonunda ise hücre ölümünün en fazla olduğu grupların sırasıyla HK1, HK2, CK1 ve CK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinin olduğu tespit edilmiştir.

4.7.2. Fibroblast Hücrelerinde Katalaz Aktiviteleri

24. saatin sonunda kontrol grubunda, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz aktiviteleri sırasıyla 71,23±17,34 U/mg protein, 91,65±17,16 U/mg protein, 92,35±11,13 U/mg protein, 114,3±34,52 U/mg protein ve 143,71±36,73 U/mg protein olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde katalaz aktiviteleri kontrol, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin

uygulandığı gruplarda sırasıyla 68,82±20,12 U/mg protein, 115,74±11,68 U/mg protein, 132,03±12,54 U/mg protein, 154,35±12,74 U/mg protein ve 192,16±31,72 U/mg protein olarak bulunmuştur. 24. saatin sonunda HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde, 48. saatin sonunda ise CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz aktiviteleri kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). 24. saatin sonunda CK1 ve CK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz aktivitesi kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmasına rağmen bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0,05$).

4.7.3. Fibroblast Hücrelerinde SOD Aktiviteleri

24. saatin sonunda kontrol grubunda, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde SOD aktiviteleri sırasıyla 27,82±7,83 U/mg protein, 29,71±10,03 U/mg protein, 29,13±12,51 U/mg protein, 31,72±13,5 U/mg protein ve 34,74±14,43 U/mg protein olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde SOD aktiviteleri kontrol, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda sırasıyla 29,81±9,82 U/mg protein, 32,13±13,04 U/mg protein, 32,57±16,51 U/mg protein, 32,92±15,74 U/mg protein ve 33,51±12,53 U/mg protein olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan tüm kremler ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilen fibroblast hücrelerinde SOD aktivitesinde artış görülmesine rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

4.7.4. Fibroblast Hücrelerinde MDA Düzeyleri

24. saatin sonunda kontrol grubunda, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde MDA düzeyleri sırasıyla 787,25±73,42 nmol/mg protein, 585,12±80,14 nmol/mg protein, 587,14±84,53 nmol/mg protein, 484,7±60,03 nmol/mg protein ve 387,82±63,52 nmol/mg protein olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde MDA düzeyleri kontrol, CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda sırasıyla 763,4±77,9 U/mg protein, 480,84±111,83 U/mg protein, 431,96±102,68 U/mg protein, 278,08±77,06 U/mg protein ve 245,93±59,71 U/mg protein olarak bulunmuştur. Çalışmada kullanılan tüm kremler ile 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilen fibroblast hücrelerinde MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür

($p < 0,05$). 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerinde MDA düzeylerindeki azalma en fazla HK2, sonra sırasıyla HK1, CK2 ve CK1 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, kozmetik sektöründe doğal aktif maddelerin, özellikle bitki özleri ve yağlarının kullanımı hızla artmıştır. Bunlar, anti-aging, anti-solar, kırışıklık önleyici gibi cildin yapısını, esnekliğini ve nemini düzenleyici etkiye sahip maddelerdir. Bitkilerin veya bitkisel ürünlerin kozmesötik preparatlarda kullanımı çok uzun yıllar öncesine dayanmaktaysa da modern kozmetik ürünlerde kullanımı son yıllarda yaygınlaşmıştır. Özellikle bitkisel ekstratlar kozmesötiklerin içeriğindeki en önemli antioksidan kaynaklarıdır (132,133). Bitkisel ürünlerin en önemli avantajlarından birisi, ürünü kullanan kişilerde istenmeyen etkilerin görülme olasılığı nispeten daha azdır. Bazı bitkisel ürünlerin oldukça faydalı etkileri bulunmasına rağmen, bazıları oldukça toksik etkiye sahip olabilmektedirler. Bu nedenle kozmesötiklerin içeriğine giren bitkisel ürünlerin etkinlik ve güvenliklerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir (133). Tüm bunlar göz önünde bulundurularak, bu çalışmada, önemli bir aromaterapi maddesi olan şeftali çekirdeği yağının etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma, öncelikle, atık madde olarak görülen şeftali çekirdeklerinin geri kazanımı açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla, öncelikle, şeftali çekirdeklerinden bu sektörde kullanılan mevcut izolasyon yöntemlerinden daha avantajlı olduğu düşünülen süper kritik karbondioksit ekstraksiyonu yöntemiyle şeftali çekirdeği yağı elde edilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. İzolasyon, tez projemizin ortağı olan Doğal Destek Ürünleri Araştırma San.Tic.A.Ş tesislerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen yağ, piyasadaki benzerlerine göre, saflık, verim ve impürite açısından üstünlük arz etmektedir. Sağlıklı gönüllülerde yapılan “Dermatolojik Güvenlik Testleri”, elde edilen yağın eriteme yol açmadığını dolayısıyla, kozmetik formülasyonlarda kullanıma uygun olduğunu göstermiştir. Yağın saflık ve güvenlik açısından incelenmesinin ardından uygun kozmetik formülasyonların hazırlanması çalışmalarına geçilmiştir.

Şeftali çekirdeği yağı, emolyen ve antioksidan etkisi, kolayca deriye penetre olabilmesi, cildin elastikiyetini yitirmesini geciktiren yağ asidi ve yaşlanmayla ilgili metabolik prosesleri geciktirici vitamin A ve E içeriği nedeniyle, anti-aging ürünlerin terkibine girmektedir. Argan yağı gibi önemli anti-aging etkili ürünlerle benzer aktiviteye sahiptir. Ancak, diğer anti-aging etkili yağlara kıyasla önemli düzeyde iritasyon özelliği bulunmamaktadır. Bu nedenle, özellikle alerjik ciltlere sahip kişiler için hazırlanan kozmetik

ürünlere konması önerilir. Şeftali çekirdeği yağı, yüksek oranda içerdiği linoleik asit (%31-80) nedeniyle önemli bir nemlendiricidir. Linoleik asit, cildin daha derin tabakalarına penetre olarak nemlendirici etkinin daha uzun süre ve yoğun bir biçimde kalmasını sağlamaktadır. Pek çok diğer standart nemlendirici ürün ise, bu özelliğe ancak formülasyona omega-9 ilavesi ile sahip olabilmektedir.

Piyasada yer alan ürünlerin içeriğinde bulunan şeftali çekirdeği yağı, soğuk press yöntemiyle elde edilmektedir. Ülkemiz piyasasında yapılan incelemeler neticesinde sadece şeftali çekirdeği yağı içeren kozmetik ürüne rastlanmamıştır. Ancak, çeşitli bitkisel özütler ve yağlar içeren bazı anti-aging etkili kozmetik ürünlerin terkibine girdiği tespit edilmiştir. Bu proje kapsamında farklı bir teknikle ülkemizde yetişen şeftalilerin çekirdeğinden elde edilen yağın anti-aging etkisinin olup olmadığını anlamak amacıyla kold krem ve hidrofilik merhem bazlı formülasyonlar hazırlanmıştır. Şeftali çekirdeğinin yağının etkisini tam olarak değerlendirebilmek için bu basit krem formülasyonlarına başka herhangi bir aktif madde ilave edilmemiştir.

Çalışmamızın ilk kısmında farklı konsantrasyonlarda (%0.5-6 a/a) şeftali çekirdeği yağı içeren formülasyonların hazırlanması, fizikokimyasal ve kozmetik açıdan en uygun olanının seçilmesi hedeflenmiştir. Daha sonra ise, seçtiğimiz formülasyon tipleri ile oluşturulan ürünlerin salon testleri yapılarak parametrik ve nonparametrik veriler yoluyla, objektif ve subjektif olarak kullanıcıların bu konudaki düşünceleri değerlendirilmiştir.

Öncelikli olarak şeftali çekirdeği yağının %31-90 oranında oleik ve linoleik asit karışımı olduğunu ve yapılan çalışmalarda cilt üzerinde herhangi bir toksik etkisinin görülmediği belirlenmiştir. Doymamış yağ asitleri Stratum corneum'dan geçişe katkıda bulunarak su tutucu özelliğini ikiye katlarlar. Deriden geçişi düzenleyen yağ asitleri; linoleik ve α -linoleik asitlerdir. Şeftali çekirdeği yağında da %50-60 oranında linoleik asit bulunduğundan şeftali çekirdeği yağının nemlendirici etkisi ön plana çıkmaktadır.

Çalışmayı planlarken şeftali çekirdeği yağının nemlendirici, sebum düzeyini artırarak kırıksıklıkları önleyici etkisini ortaya koyabilecek, kullanımı rahat ve piyasa koşullarında daha çok tercih edilen krem tarzı formülasyon tercih edilmiştir. Şeftali çekirdeği yağının lipofilik karakterde olmasından dolayı yağ oranı yüksek olan emülsiyon tarzda formülasyonların kullanılmasına karar verilmiştir. En yaygın ve bilindik temel formülasyonlardan olan kold

kremin ve hidrofilik merhemın sıvağ olarak kullanılmasına karar verildi. Her iki formülasyon da yüksek yağ oranına sahip olup, kold krem deri üzerinde yağlı bir his bırakırken, hidrofilik merhem daha çok dış fazının su olmasından ötürü yağlı his bırakmamaktadır.

Yaptığımız literatür çalışmasında da şeftali çekirdeği yağı ile ilgili tam olarak hangi oranın kullanılması gerektiğine dair kesin bir yanıt bulanamadı. Bununla beraber yaptığımız literatür incelemeleri sırasında Yamada ve ark. (134)'nin molsidomine üzerinde yaptıkları bir çalışma sırasında kullandıkları oleik ve linoleik asitlerin en iyi emilimlerinin % 2 oranında olduğunu gördük. Oleik ve lionelek asitin; şeftali yağını oluşturan bileşenlerden en önemlileri olması nedeniyle formülasyonlarımızda % 0,5 - 6 arasında şeftali çekirdeği yağı kullanmaya karar verildi.

Hazırladığımız formülasyonlar için; Türk Kozmetik yönetmeliği, Avrupa Farmakopesi 1995 (Türkçe adaptasyonu) ve Avrupa Kozmetik Birliği (COLIPA) istekleri incelendiğinde bu konuda kaynak oluşturabilecek bir bilginin olmadığını gözlemledik. İnceleyeceğimiz ürünlerin tümünün kozmetik olması nedeniyle her ne kadar farmakolojik etkiye sahip bir etkin madde içermeseler de formülasyonların farmasötik ürünlere olan benzerliğinden ve deri yüzeyine uygulanmalarından dolayı, viskozluk, pH, emülsiyon tipinin belirlenmesi ve mikrobiyolojik kontrol çalışmasının yapılmasına karar verildi.

Yaptığımız literatür incelemesinde şeftali çekirdeği yağının analizine yönelik çalışmalara rastlasak da bu çalışmaların şeftali çekirdeği yağının bileşimini açıklamaya yönelik olduğunu gözlemledik. Ancak, tüm kozmetik formülasyonlarda olduğu gibi şeftali yağı içeren ürünlerin stabilitesine ait bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu amaçla, hazırlamış olduğumuz ürünlerin raf ömrü boyunca fiziksel açıdan ne gibi bir değişime uğrayabileceğini gözlemek amacıyla 6 ay süresince $+4^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ve $30^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ sıcaklığında hızlandırılmış stabilite çalışmaları yapıldı. $+4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de tutulan kremlerde 4. aydan sonra faz değişimi gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, ürünlerin buzdolabında değil de oda sıcaklığında muhafazası uygundur.

Yaptığımız ön çalışmalarda formülasyon yapısının emülsiyon tarzı olduğu belirlendi. Emülsiyon tipi formülasyonlarda stabilite açısından viskozluk büyük önem arz eder. Bu nedenle; stabilite çalışmamızda viskozite değerleri taze hazırlanmış formülasyonlarda ve 6 aylık stabilite çalışması süresi sonunda incelenmiştir. Viskozite değerlerinin istatistiksel

olarak anlamlı bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca, tüm formülasyonlar mikroskop altında incelenerek emülsiyonların iç fazlarının damlacık büyüklüklerinin dağılımına bakılmıştır. Işık mikroskobuyla yapılan ve en az 300 damlanın gratikül kullanılarak sayımına dayanan tayinde 6 aylık stabilite çalışması sonunda dahi ortalama damlacık büyüklüğünün bir mikrometrenin altında olduğu görüldü. Damlacık büyüklüğü tespit çalışması sırasında ilginç bir bulguya da rastlandı. Formülasyonların büyük bir çoğunluğunda yer yer sıvı kristal yapılara dönüşümün olduğu gözlemlendi. Bütün bu nedenlerden dolayı, elimizdeki imkanlar çerçevesinde partikül büyüklüğü ve dağılımı detaylı olarak belirlenemedi. Ancak, stabilite öncesi ve sonrası gözlemler ampirik olarak karşılaştırıldığında damlacık büyüklüklerinde irileşme olduğu belirgin bir şekilde görüldü. Bu sonuç bize stabilite çalışması sonucunda viskozitenin düşebileceğini düşündürdü. Gerçekten de yaptığımız çalışmalar sonucunda, incelenen formülasyonların tamamında viskozite sonuçlarının büyük oranda düştüğü gözlemlendi. Her biri farklı formülasyonlardan oluşan kold krem ve hidrofilik merhem bazlı formülasyonlarda da stabilite çalışması sonucunda benzer düşüşler görüldü. Tüm formülasyonlarda düşüşlerin paralellik göstermesi, viskozitedeki bu düşüşün şeftali çekirdeği yağının bileşimindeki maddelerin stabilite şartlarında bozulma ve ayrışmaya uğraması nedeniyle olabileceğini düşündürmektedir. Bu düşüşle özellikle +4°C’da muhafaza edilen formülasyonlarda belirgindir.

Emülsiyon tipinin belirlenmesi çalışmaları sonucunda; kold kremin s/y, hidrofilik kremin ise y/s tibi emülsiyon olduğunu gözlemledik. Özellikle dış fazın su olduğu hidrofilik formülasyonumuzda derinin önce formülasyonla nemlendirilmesinin daha sonra ise şeftali çekirdeği yağı ile bunun sürdürülmesini hedefledik. Wester ve Noonan (135) yaptıkları çalışmada deriden emilen maddelerin emilimin yüzey alanı ve konsantrasyonla orantılı olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, formülasyonlardaki su içeriği son derece önemlidir. şeftali çekirdeği yağı ile tek başına nem artışı sınırlıyken hidrofilik formülasyonla derinin formülasyondan kazandığı nemin deri üzerinde kalmasını mümkün kılarak nem artışını sağlayabilir.

şeftali çekirdeği yağı içeren tüm formülasyonlarda pH değerleri 5-7.5 arasında bulundu. Yağın tek başına lipofilik özelliğinden dolayı doğrudan doğruya pH’sı ölçülemese de yağ asidi özelliğinden dolayı sulu çözeltilerinde pH’nın, asit bölgeye kaymasına neden olmaktadır. Bu yağ ile hazırlanan kremlerin pH’nın hafif asidik olması deriye uygulanabilir preparatlar açısından uygun bulundu. Bu nedenle, salon testleri sırasında formülasyonların pH

açısından herhangi bir olumsuzluk içermediğine görüldü. Hazırladığımız formülasyonların pH'larının deri pH'sı ile son derece uyumlu olduğuna karar verildi.

Formülasyonlar salon testlerinde kullanılmadan önce mikrobiyolojik kontaminasyon testine tabi tutuldu. Hazırladığımız formülasyonlardan hiç birinde mikrobiyolojik kontaminasyon görülmedi. Patolojik mikroorganizmalara rastlanmadı. Mikrobiyolojik kontroller çerçevesinde bütün formülasyonlar incelendi; herhangi bir mikrobiyolojik problem olmadığı ve şeftali çekirdeği yağının diğer tüm formülasyonlarda mikrobiyolojik açıdan herhangi bir sorun yaratmadığı sonucuna varıldı. Buna ilaveten, şeftali çekirdeği yağının yüksek oranda içerdiği oleik ve linoleik asitten dolayı konsantrasyona bağlı olarak artan şekilde bakterisit ve fungusit özellik de ihtiva etmektedir. Bu da hazırlanan formülasyonlarda stabilite çalışması süresince bakteri ve fungus üremesinin olmamasının nedenini açıklamaktadır.

Hazırladığımız formülasyonların tümünde kullanım amacı olarak derinin nemlendirilmesi, oksidatif stresin azaltılması, sebum düzeylerinin artırılması ön plandadır. Bu nedenle, formülasyonlarımızın sebum düzeyleri üzerine etkileri ile antioksidan aktivitelerinin incelenmesine karar verildi. Krem tarzı formülasyonların düzenli kullanılmaya uygun olması ve düzenli kullanıldığında daha etkili olması nedeniyle salon testinin 1-24 saatlik sürelerle incelenmesi uygun bulundu. 24 saati aşan 15-30 günlük çalışmalar tarafımızca başlatılmışsa da çalışmaya katılan sağlıklı gönüllülerin sürenin uzamasıyla uygulama planına riayet etmedikleri tespit edilmiş, sonuçların güvenilirliğinin tartışmalı olması nedeniyle, salon testinde 24 saaten sonrası bu çalışmada kapsam dışı bırakılmıştır.

Formülasyonlar gerekli kontroller yapıldıktan sonra salon testleri yapılmak üzere içeriğinin hangi ürüne ait olduğu anlaşılmayacak şekilde standart olarak ambalajlandı. Böylelikle kullanıcıların formülasyonları tanıyıp psikolojik açıdan etkilenmelerinin önüne geçilmesine çalışıldı. Deneklerin sebum ölçümleri, sebumetre ile aynı yerde, $24^{\circ} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'deki laboratuvar ortamında yapıldı. Kremler cilde uygulandıktan sonra, en geç 10 dakika içinde ölçümler yapıldı.

Hazırladığımız formülasyonların tamamının yüze uygulanabilir nitelikte olmasından dolayı, gönüllü kullanıcılardan kozmetik kremlerin kullanımına uygun bölgeler olan alın, yanaklar ve çenede kremleri kullanmaları istendi. Öncelikle, sağlıklı gönüllülerde herhangi bir

kozmetik ürün uygulaması yapılmadan önce bu bölgelerin sebum değerleri ölçüldü. Sağlıklı gönüllüler seçilirken kremlerin etkisini değiştirebileceğinden dolayı, akne vb. dermatolojik sorunları olmayan ciltlere sahip kişilerle, erkeklerde sakalı bulunmayan denekler tercih edilmiştir. Erkeklerin traş olduktan sonra herhangi bir traş sonrası ürün kullanmamış olması; bayanların da makyaj yapmamış olması şart koşulmuştur. Birçok literatürde de olduğu gibi çalışmamıza katılan deneklerin farklı yüz bölgelerinde sebum miktarlarının değişiklikler gösterdiği belirlendi. Sağlıklı gönüllülerde yapılan çalışmalarda sebum düzeylerini azalttığı, hidrofilik merhem bazlı formülasyonların ise arttırdığı görülmüştür. Sebum düzeylerinin artması cildin esnekliğinin artmasını sağlamakta ve dolayısıyla, kırışıkların oluşmasını önlemekte/geciktirmektedir.

Hazırlanan formülasyonların anti-aging etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan ex vivo hücre kültürü çalışmaları, öncelikle, hayvan deneylerine alternatif bir yöntem olarak fibroblast hücre kültürünün kullanılması açısından önem taşımaktadır (136,137). Deri fibroblast hücreleri yoğun UV ışımına maruz kalmadığı sürece çok yavaş yaşlanmaktadır. Bu nedenle erişkin fibroblast hücreleri için hücre kültürünün yapıldığı süreç deri yaşlanması için oldukça kısa bir süre olduğundan dolayı belirgin bir oksidatif stres meydana gelememektedir. Bu sebeple çalışmamızda hızlı bölünen ve bu nedenle oksidatif strese maruziyet ihtimali çok daha yüksek olan embriyonik fibroblast hücrelerinden yararlanılmıştır (136,137,138). Yaptığımız literatür taramasında hücre kültürüne uygulanacak numune miktarını belirten bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak, çeşitli literatürlerde deri yüzeyine uygulanması gereken anti-aging kremin 1 cm² deriye 1-2 mg gelecek şekilde olması gerektiği belirtilmişti (139,140). Kullandığımız flaskların da taban yüzey alanı yaklaşık 10 cm² olduğundan dolayı, kullanmamız gereken krem miktarının flask başına 10-20 µL olması gerektiği kararına varılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız kremlerin çok yoğun olması, dolayısıyla hücre kültür ortamını bozabilme ihtimali nedeniyle flask başına 10 µL anti-aging krem olacak şekilde krem miktarının ayarlamasını yaptık. Anti-aging krem uygulaması için fibroblast hücrelerini içeren her bir flaska içerisinde 10'ar µL numune bulunan 100'er µL numune süspansiyonlarından eklenmiş ve 24 ve 48 süre ile inkübe edilmiştir. Yaptığımız çalışmada dört farklı anti-aging kremin fare embriyonik deri fibroblast hücreleri üzerindeki antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu üzerindeki etkileri ile bu kremlerin bazı fiziksel özellikleri incelenmiştir.

Deride serbest radikal üretimine bağlı olan oksidatif stres, kutanöz yaşlanmanın en önemli nedenlerinden biridir (141). Deride hücrel proteinler, enzimler, DNA, RNA ve hücre membranındaki doymamış yağ asitleri üzerindeki oksidatif hasar derinin doğal savunma mekanizmasını bozar. Serbest radikallerin varlığında UV radyasyonu, başlıca dermisteki kollajen ve elastin lifleri olmak üzere, epidermin ve dermin lipidlerini, proteinlerini etkileyerek keratinizasyon bozukluklarına neden olmaktadır (141-143).

Deri oksidatif stresten korunmak için antioksidanlara gerek duyar (156). Antioksidanlar reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucu mekanizmalardır. Oksijen radikalleri belli bir seviyenin üzerine yetersiz kaldığı durumlarda zararlı olabilirler.

Bütün aerobik organizmalar, enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlarla serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmaktadır. En önemli antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz-redüktaz, membran lipoproteinlerini ışığa bağlı hasardan ve yaşlanmadan korur (144,145).

Piyasada topikal olarak uygulanan anti-aging preparatlarda anti-oksidan özelliğindeki vitaminlerin kullanılması oldukça yaygındır (73). Bu vitaminlerin en önemlileri A, C ve E vitaminleri olmakla birlikte B1, B2, B5, B6, B12, D ve K vitaminleri kullanılan diğer vitaminler arasında yer almaktadır. A vitamini anti-aging preparatlarda retinoik asit, retinol, retinal, retinil palmitat ve retinil asetat formlarında, E vitamini α - tokoferol, α - tokoferol asetat ve α - tokoferol sorbat formlarında, C vitamini ise L-askorbik asit, askorbil glukosid, askorbil palmitat, askorbil fosfat ve magnezyum askorbil fosfat formlarında kullanılmaktadır (73,139,140).

Günümüz kremlerinde sıklıkla kullanılan E vitamini türevleri α - tokoferol, tokoferol asetat ve tokoferol linoleattır (73,140). Bunlarda özellikle tokoferol asetat ve tokoferol linoleat doğal nemlendirici özelliği nedeniyle saç ve cilt bakım ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (73,140). Thiele ve arkadaşları, E vitamininin epidermisteki major antioksidan olduğu, azalmasının çevresel oksidatif hasar için erken ve hassas bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (148). Yapılan çalışmalarda tokoferol asetatın deriden çok iyi absorblanabildiği ancak biyolojik aktif form olan α - tokoferole yeteri kadar dönüşmediği gösterilmiştir (148). Gallardo ve arkadaşları, vitamin E'nin % 2'lik lipojel ve hidrojel formülasyonlarının yaşlanma tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (149). Hidrojel formülasyonunun fotohasarlı

deride antioksidan olarak, lipojel formülasyonunun ise fotohasarlı ve ayrıca kronolojik olarak yaşlanmış deride antioksidan özelliğiyle kullanılabileceğini söylemişlerdir (149). Yaptığımız çalışmada kremlerin içerisinde aktif formu olan α -tokoferol ve tokoferol asetat mevcuttur. Tokoferol asetatın güçlü nemlendirici özelliği, α -tokoferolün ise güçlü antioksidan özelliğinden dolayı anti-aging kreminde tercih edildiğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmada da hem 24 saat hem de 48 saat süre ile inkübe edilen hücrelerdeki katalaz aktivitesinin en yüksek ve MDA düzeyinin en düşük olduğu grubun HK2 kodlu krem uygulanan grup olması, konsantrasyon arttıkça bu etkinin arttığını göstermektedir.

Hazırladığımız kremler, içerdikleri şeftali çekirdeği yağında E vitamininin bulunması nedeniyle güçlü antioksidan özellik taşımasının yanı sıra A vitaminini de bulundurmaktadır(73). A vitamini ve türevleri genellikle güneş ışığı altında degrades olduklarından dolayı, genellikle gece bakım kremlerinde tercih edilmektedir. A vitamini hem tamir edici mekanizma ile hem de var olan hasarın ilerlemesini engelleyerek fotohasarı gidermeye yardımcı olur (73,140). Weinstein ve arkadaşları, retinoik asidin, deride UV teması sonrası hasar oluşturan metalloproteinazlar üzerinde inhibitör etki göstererek kollajen yıkımını azalttığını gözlemlemişlerdir (150). Shapiro ve arkadaşları ise A vitamininin keratinosit ve fibroblast profilyasyonunu aktive ettiğini, bu sayede daha fazla kollajen ürettiğini ve dermisi kalınlaştırarak travmalara karşı direnci arttırdığını bildirmişlerdir (151). Ayrıca kollajen üretiminin artması, kırışıklık ve derin çizgilerin giderilmesinde ve UV'den kaynaklanan pigmentasyonu inhibe etmektedir (151). Formülasyonlarımızın içerdiği şeftali çekirdeği yağının yapısında bulunan retinil palmitat en kolay formularize edilebilen retinoid olup kutanöz enzimatik ester bağı ile retinol ve retinoik aside dönüşerek aktif hale dönüşür. Retinol esteri yapısında olan retinil palmitat, epidermisin fizyolojik yapısındaki en yaygın A vitamini formudur. Bu nedenle kozmetik ve kozmesötiklere sıklıkla konulmaktadır. Retinil palmitatın moleküler ağırlığı büyük olduğundan dolayı formülasyonlarda stabildir. Diğer retinil ve retinol esterleri gibi UV ışınlarını absorblama yeteneğine sahiptir. Retinil palmitatın topikal kullanımı ile UV'ye bağlı oluşan DNA hasarı ve eritem önlenmektedir. Retinil palmitatın deri yaşlanmasıyla ilgili klinik çalışmalar yeterli olmasa da güçlü bir anti-oksidan özelliğe sahip olduğu bilinen bir gerçektir (73,151).

Yaptığımız çalışmada, kullandığımız şeftali çekirdeği yağı antioksidan vitaminler olan A, ve E vitaminleri kombine halde içermektedir. Çalışmamızda her iki süre sonunda da fibroblast hücre homojenizatlarında MDA düzeyinin en düşük, katalaz aktivitesinin ise en yüksek olduğu grubun HK2 grubu olması konsantrasyona bağlı olarak antioksidan etkinin

arttığına göstergesidir. Çalışmamızda yer alan CK1 ve HK1 kodlu kremlerde düşük oranda şeftali çekirdeği yağı bulunmasından ötürü antioksidan vitamin düzeyi azdır. Hem 24 saat hem de 48 saat süre ile CK1 ve HK1 kodlu kremlerle inkübe edilen fibroblast kültürlerinde MDA düzeyinin diğer formülasyonlara nispeten azalması ve katalaz seviyesinin artması preparatlarda bundan dolayıdır.

HK2 kodlu kremin uygulandığı hücrelerde katalaz aktivitesinin HK1 kodlu kremin uygulandığı gruba kıyasla yüksek, MDA düzeyinin ise düşük olmasının sebebi, HK2'nin içerisindeki şeftali çekirdeği yağının yüksek konsantrasyonda olmasına bağlı olarak antioksidan vitamin konsantrasyonunun HK1'e nazaran daha yoğun olabileceğinden kaynaklanıyor olabilir (122,140). CK2 ile yine aynı tip formülasyon olan ancak daha düşük konsantrasyonda şeftali çekirdeği yağı içeren CK1 kreminin uygulandıkları hücrelerdeki katalaz aktivitesindeki artış ve MDA düzeyindeki azalış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm gruplardaki SOD aktivitesinin ise kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark göstermemesinin nedeninin ise fizyolojik şartlarda oluşan lipid peroksidasyonunun SOD aktivitesini tüketmesinden ve belirli bir düzeyde tutmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz (140,143).

Yaptığımız çalışmada CK1, CK2, HK1 ve HK2 kodlu kremler 48 saat boyunca inkübe edildiğinde fibroblast hücrelerinde katalaz ve SOD aktivitelerindeki artış, yine bu kremler ile 24 saat boyunca inkübe edilen fibroblast hücrelerindeki artışa nazaran daha yüksek bulunmuştur. Kontrol grubunun 48. saatin sonundaki katalaz aktivitesi ile 24. saatin sonundaki katalaz ve SOD aktivitesi kıyaslandığında, 48. saatin sonundaki katalaz aktivitesi daha düşük, SOD aktivitesi ise daha yüksek bulunmuş, bu durumun krem uygulaması yapılmayan fibroblast hücrelerinde zamana bağlı gözlenen lipid peroksidasyonundan kaynaklandığı kanaatindeyiz (152,153).

Çalışmamızda her dört krem ile inkübe edilen fibroblast hücrelerinde MDA düzeyleri her iki sürenin sonunda da düşüş göstermektedir. Ancak 48. saatin sonundaki düşüş 24. saatin sonundaki düşüşe kıyasla istatistiksel olarak daha anlamlı bulunmuştur. Bunun nedeninin anti-aging kremlerin uzun süre ile kullanımı sonucunda daha iyi bir antioksidan etki meydana getirdiğinden ve ortamdaki serbest radikalleri daha fazla süpürdüğünden dolayı olabileceği düşüncesindeyiz (152,153). Kontrol grubunun 48. saatin sonundaki MDA düzeyi ile 24. saatin sonundaki MDA düzeyi kıyaslandığında, 48. saatin sonundaki MDA düzeyi daha yüksek

bulunmuş, bu durumun krem uygulaması yapılmayan fibroblast hücrelerinde zamana bağlı gözlenen serbest radikal miktarındaki artıştan kaynaklandığını düşünmekteyiz (152,153).

Yaptığımız çalışmada fibroblastlardaki katalaz ve SOD aktivitesindeki artışın en fazla olduğu grubun HK2 kodlu kremin uygulandığı grup olduğu görülmüştür. HK2 kodlu krem hidrofilik merhem bazlı bir kremdir ve yüksek oranda (%4) şeftali çekirdeği yağı içermektedir. Bu nedenle, içerisinde yüksek oranda bulunan A ve E vitaminleri ile güçlü bir serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu düşünmekteyiz (73,152,153). İkinci sırada yer alan ise CK2 kodlu kremdir.

Tüm uygulama gruplarında 48. saatin sonundaki katalaz ve SOD aktivitesindeki artış, 24. saatin sonundaki artışa, 48. saatin sonunda MDA düzeyindeki azalış ise 24. saatin sonundaki azalışa göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebi hücrelerin anti-aging kremler ile uzun süreli inkübe edildiğinde antioksidan savunma sistemin daha fazla devreye girmesi ve serbest radikal süpürme etkisinin daha yoğun olmasından kaynaklandığı kanaatindeyiz (152,153).

Kullandığımız tüm kremlerin cildin pH aralığında bulunması deri-krem uyumluluğu ve oluşabilecek bir alerjik irritasyonun önüne geçilebilmesi açısından önem taşımaktadır (154,155). Çalışmamızda kullandığımız kremler, 1:9 (v/v) oranında DMEM tamponu ile sulandırılmıştır. Bu sayede hem kremin yoğunluğu azaltılmış hem de asıl önemlisi kremlerin pH'sının, fibroblast hücrelerinin çoğalma pH'sı olan 7,2'ye tamponlanması ve hücre kültürünün pH'sında olası bir değişimin önüne geçilmesi mümkün olmuştur (154,155).

Elimizdeki tüm kremlerin emülsiyon tipleri incelendi ve cold kremlerin s/y tipi , hidrofilik merhem bazlı olanların ise y/s tipi emülsiyon olduğu belirlendi. Çalışılan kremlerden y/s tipi emülsiyon olanlar, derinin nemlendirilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca, maliyetinin az, hazırlanmasının kolay olması, sıcaklık değişikliklerinden kolayca bozulmaması, yağ fazının kolayca kokuşmaması ve görünüşlerinin estetik açıdan güzel olması y/s tipi emülsiyonların en önemli özellikleridir. y/s tipi emülsiyon kullanılan anti-aging kremlerin muhteviyatında C vitamini su fazının içerisinde, A ve E vitaminleri ile bitkisel yağlar ise yağ fazının içerisinde çözünmektedir (73,123,140,145,156). Bunlar, gündüz kremi olarak önerilebilir. s/y tipi cold krem kremler ise, daha ziyade gece kremi olarak tavsiye edilebilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmayı tasarlarken amacımız süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile elde edilen şeftali çekirdeği yağının anti-aging etkili kozmetik ürünlerde kullanılabilirliğini araştırmak, böylelikle ülkemiz için bir gelir kaynağı olarak öneminin artmasına katkıda bulunmaktır. Aynı zamanda, şeftali çekirdeği yağı ile birlikte pek çok bitkisel özüt ve yağ içeren bazı anti-aging etkili kozmetik ürünlerin piyasada bulunması nedeniyle, kullanıcıların iddia edilen yararları sağlayıp sağlamadığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu ise, tüketici hakları açısından önemlidir.

Bu çalışma sonucunda; laboratuvarımızda hazırlanan şeftali çekirdeği yağı içeren formülasyonların öncelikle stabilite problemi içermediği görüldü. İncelenen tüm ürünlerin, pH ve viskozluk açısından deriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte; hazırlanan formülasyonlardan fiziksel ve kozmetik özellikleri uygun olanların, kadın ve erkeklerin alın, çene, yanak gibi farklı bölgelerine uygulanması sonucunda şeftali çekirdeği yağı içeren preparatların sürüldüğünde derinin sebum değerlerini arttırarak esneklik kazandırdığı belirlendi. Bu da deride kırışıklıkların oluşumunu engelleyecektir. Bu özelliklerinin piyasa preparatıyla uyumlu olduğu tespit edildi. İritasyon çalışmalarında şeftali çekirdeğinin hem kendisi hem de bunu içeren formülasyonlarımız eritem oluşumuna sebep olmamıştır. Salon testlerinin sonuçları cinsiyete ve yaşa bağlı değişiklik göstermemektedir. Fibroblast hücre kültüründe yapılan etkinlik testlerinde ise, antioksidan özelliğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna göre, CK2 formülasyonu gece, HK2 formülasyonu ise, gündüz kremi olarak önerilebilir.

Ülkemizde son yıllarda önem kazanan ve hızla gelişen kozmetik sektöründe hazırlanan ürünlerin etkinlik testlerinde klasik yöntemler kullanılmaktadır. Oysa, insan deri fibroblastlarıyla gerçekleştirilecek hücre kültürü tekniğinin kozmetik ürünlerde etkinlik ve toksisite ile ilgili kontrol çalışmalarında kullanılmasıyla daha güvenli ve etkin ürünler elde edilmesi mümkün olacaktır. Bu tez çalışmasında laboratuvarımızda geliştirdiğimiz hücre kültürü yönteminin şeftali çekirdeği yağı içeren kremlerin etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanımı önerdiğimiz bu ex vivo yöntemin uygulanabilirliğine dair oluşturduğumuz veri bankasına önemli katkı sağlayacaktır. Bu veri bankası ve bunun oluşturulmasında kullanılan verilerin elde edildiği çalışmalarımız, ülkemizde anti-aging preparatlar üreten kozmetik

sektöründe kalite kontrol çalışmalarında kullanılacak hücre kültürü tetkik yönteminin optimizasyonu açısından önemlidir.

Literatürde hücre kültürü tekniğinin kozmetik ürünlerde kullanımına ait sadece birkaç çalışmanın yer alması, tezin kozmetik bilimine önemli bir katkı sağlayacağını göstermektedir. Anti-aging ürünlerin üretildiği kozmetik sektöründe uygulanabilir hızlı ve etkin bir metodun geliştirilmesi, ülkemizde bu sektöre büyük katkı ve kazanım sağlayacaktır. Çalışmanın asıl amacı olan süperkritik karbondioksit ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiş şeftali çekirdeği yağının özellikle anti-aging etkili kozmetik ürünler açısından etkinlik ve güvenliğinin in vitro ve in vivo çalışmalarla desteklenmesi, aslında bir bitkisel atık madde olan bu yağın ülke ekonomisine kazandırılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın Farmasötik Biyoteknoloji'nin kozmetolojide önemli bir uygulama alanı olacağı düşünülmektedir. Fitokozmetikler alanında önemli bir kaynak teşkil edecektir.

Laboratuvarımızda bu çalışmada elde edilen veriler ışığında uzun süreli salon testleri, gerçek zamanlı stabilite çalışmaları ve sinerjik etki sağlayabileceği düşünülen kozmetik aktiflerin ilavesiyle nanopartiküler kozmetik formülasyonların hazırlanması çalışmaları sürdürülmektedir.

KAYNAKLAR

1. http://translate.google.com.tr/translate?hl=tr&langpair=en%7Ctr&u=http://www.naturaltoucharomatherapy.com/carrier-oils-peach-kernel-c-2_12.htm
2. Woodland Garden Sunny Edge; Dappled Shade; South Wall. By. West Wall. By.
3. http://www.fromnaturewithlove.com/soap/product.asp?product_id=oilpeachker.
4. **Rahma EH, Abd El-Aal MH.** Chemical characterization of peach kernel oil and protein: Functional properties, in vitro digestibility and amino acids profile of the flour [purchase](#)
5. <http://www.dogaldestek.com.tr/urunler/seftali-cekirdegi-yagi-damla>.
6. **AdıŖen E.** Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2007**.
7. <http://www.saglik.im/ter-bezleri/>
8. (Prof.Dr. Mustafa ŖENOL İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dermatoloji Anabilim Dalı)
9. (Anadolu Üniversitesi Kozmetoloji Anabilim Dalı)
10. (**Jakobovic HR, Ackerman AB.** Structure and function of the skin: development, morphology, and physiology. In: Dermatology, Moschella, S.L., Hurley, H.J. (Eds), WB Saunders Company, Philadelphia, **1992**, s. 3-87.)
11. **Monteiro-Riviere NA.** "Comparative anatomy, physiology and biochemistry of mammalian skin", Dermal and ocular toxicology: Fundamentals and methods, (Ed: DW Hopson), CRC Press Inc., Florida, **1991**, s. 3-71.
12. (<http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2010/2010%20Exam%20Reviews/Exam%20%20Review/Ch%205%20Dermal%20Histology.htm>)
13. (**Nordstrom KM, Schmus HG, McGinley KJ, Leyden JJ.** "Measurement of sebum output using a lipid absorbent tape", J. Invest Dermatol., 87, 260-263, **1986**.)
14. (**Parker F.** Structure and function of the skin. In: Orkin M, Maibach HI, Dahl MV. Eds. Dermatology, Connecticut: Appleton&Lange, **1990**: 1-14.)
15. **Yazan Y.** Kozmetik Bilimi. Nobel Tıp Kitabevleri, **2004**.)
16. (Prof.Dr. Mustafa ŖENOL İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deri ve Zührevi Hastalıkları Anabilim Dalı)
17. (Modern Farmasötik Teknoloji Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar **Tuncay DEĞİM**)
18. <http://www.ciltuzmani.com/terleme.html>
19. <http://www.canlibilimi.com/ders-notlari-ve-saglik-bilgileri/derinin-biyolojik-ozellikleri-nedir.asp>
20. (<http://4.bp.blogspot.com/-CbuZ3gYIEeU/T6jWDhkVJAI/AAAAAAAAABeQ/4Iw1smiphN8/s1600/8977010-human-skin-anatomy-detail-and-accurate-eps8-labelled.jpg>)
21. **TaŖınar A.** Derinin fizyolojisi. 1. Baskı, Ankara: T.C. Ankara Üniversitesi Yayınları, **1976**: 43-60.
22. (izgü E, "Merhemler ve Farmakopeler yönünden önemleri" Genel ve Endüstriyel Farmasötik Teknoloji I, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1975, s.292-337.).

23. (DERİDEN EMİLİMVE DERİYE UYGULANAN YARI KATI PREPARATLAR Tuncer DEĞİM
Modern Farmasötik Teknoloji)
24. (Geçgil Ş, "Merhemler", Farmasötik Teknoloji'ye Başlangıç, Cihan Matbaacılık, İstanbul, 1991, s.283-294.)
25. (Swarbrick J, Boylan JC, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcei Dekker Inc., New York, 1991.)
26. (Zatz JL, Kushla GP/"Geis" Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Vol.1, (Ed: HA Lieberman, MM Rieger, GS Banker), Marcel Dekker Inc. New York, 1988, s.495-510.)
27. **Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL.** The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3rd. Ed., Lea and Febiger, Philadelphia, **1986.**
28. **Aksoy G.** Perkütan Emilme Farmakokinetiği. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara, **1988.**
29. (**Chandler JM.** Water-in-oil techology, Cosm. Toilet., 108 (11), 74-80 (**1993**)).
30. United States Pharmacopeia (USP 24-NF 19), Supp. 2, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, MD **2000.**
31. **Wilkinson JB, Moore RJ.** Skin creams. In: Harry's Cosmeticology, Wilkinson, J.B., Moore, R.J. (Eds.), George Goodwin, USA, **1982 a**, s. 50-60
32. **Güven KG.** Eczacılık Teknolojisi, Cilt I, Modern Reprodüksiyon, İstanbul, **1981.**
33. **Flynn TC, Petros J, Clark RE, Viehman GE.** Dry skin and moisturizers. Clin Dermatol, 19, 387-392, **2001**
34. **Lodén M.** The clinical benefit of moisturizers. JEADV **2005**; 19:672-88.)
35. (**Sarıcaoğlu H.** Deri bakımı. T Klin Dermatol **2005**; 1:40-7.).
36. **Rutter N.** Physiology of the newborn skin. In: Harpe: J, Oranje A, Prose N, eds. Textbook of pediatric dermatology. 1st ed. Oxford: Blackwell Science; **2000**; P. 43-53.).
37. (**Lynde CW.** Moisturizers: what they are and how they work, Skin Ther.Lett., 6 (13): 3-5 (**2001**)).
38. (**Marcoux D, Harper J.** Cosmetic dermatology in children In: Baran R, Maibach HI, eds. Cosmetics dermatology. 1st ed. Singapore, Kyodo Printing Co Ltd., 1994. P. 359-67.).
39. (**Dahms GH.** Choosing emollients and emulsifiers for sunscreen products, Cosm. Toilets., 109 (11), 45-52 (**1994**)).
40. Skin Care: Apractical guide to skin care products and ingredients. The Skin Sciences Institute, Cincinnati, 1-22, **1999**
41. Managing Eczema, The College of Pharmacy Praticce, Tutorial No: 34, 1-5, **2004**).
42. (**Kligman AM.** Cosmetics. A dermatolgist looks to the future: promises and problems Dermatol Clin **2000**; 18(4): 699-709.)
43. **Zhai H.** Preventing irritant dermatitis: The efficacy of moisturizers. Cosmet Toilet **1998**; 113:45-8.).
44. **Idson B.** Dry skin, moisturizng and emolliency, Drug Cosm. Ind., September, 40-43 (**1980**)
45. **Black D, Drildollu S, Lagarde JM, Gall Y.** Skin cere products for normal, dry and greasy skin. In: Textbook of Cosmetic Dermatology, Baran, R., Maibach, H.I. (Eds.), Martin Dunitz Ltd, London, **1998**, s. 125-150
46. **Atakan N.** Kozmetikler ve Sağlık Hacettepe Tıp Dergisi **1998**; 29 (1): 4-9)

47. **Martini MC.** Les produits hydratants. In: Actifs et Additifs En Cosmetologie, Martini, M.-C., Seiller, M. (Eds.), Tec&Doc Lavoisier, Paris, **1992**, s. 196-210.).
48. <http://tr.wikipedia.org/wiki/%C5%9Eeftali>
49. Şeftali Çekirdeğinin Değerlendirilmesi, Fen ve Teknoloji Bilim Danışmanlığı Çalıştayı, Ankara, **2008.**)
50. Saadany ve arkadaşları, 2004.; Calgaroto ve diğ., 2005
51. Morrison ve Boyd, 1981; IUPAC 2007).
52. (<http://veterinary.ankara.edu.tr/~fidanci>
53. **Mezzomo N, Mileo BR, Friedrich MT, Martinaz J, Ferreira S.R,**Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: process yield and extract composition, ¹Chemical and Food Engineering Department, 101(14):5622-32, **2010.**)
54. HÜGAM Prof.Dr. Vural Gökmen Hacettepe Üniversitesi Gıda Bilimleri Anabilim Dalı
55. (Doğal Destek Ürünleri Araştırma Sanayi ve Ticaret A.Ş. 2014)
56. **Athar M, Nasır SM. Taxonomic perspective of plant species yielding vegetable oils used in cosmetics and skin care products.** California Department of Food and Agriculture, Capitol Avenue, Suite 109, Sacramento, CA 95814, USA. 2Ministry of Environment, Capitol Development Authority, Block IV, Islamabad, **2014**
57. www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/gmu809/Karbondioksit.pdf)
58. **Yılmaztekin M, Erten H, Cabaroğlu T.** Gıda Biyoteknolojisinde Aroma Maddelerinin Süperkritik Akışkan Yöntemiyle Ekstraksiyonu **2005**; 30(4); 269-274.)
59. (**Çolak N, Tülek Y.** Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu, **2003**; 28(3): 313-320.)
60. **Cals-Grierson MM, Ormerod AD.** Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide*, **2004**; 10(4):179-193
61. **Lowe NJ.** An overview of ultraviolet radiation, sunscreens, and photo-induced dermatoses. *Dermatol Clin*, **2006**; 24(1):9-17.
62. **Calleja-Agius J, Muscat-Baron Y, Brincat MP.** Skin ageing. *Menopause Int*, **2007**; 13(2):60-64.
63. **Boelsma E, Gibbs S, Ponc M.** Expression of skin-derived antileukoprotease (SKALP) in reconstructed human epidermis and its value as a marker for skin irritation. *Acta Derm Venereol*, **1998**; 78(2):107-113. 126
64. **N, Misery L.** The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*, **2008**; 18(2):119-127.
65. **-Huang LM, McNutt NS, Krueger JG, Lowes MA.** Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases. *J Clin Immunol*, **2009**; 29(3):247-256.
66. **Koch S, Kohl K, Klein E, von Bubnoff D, Bieber T.** Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J Allergy Clin Immunol*, **2006**; 117(1):163-168.
67. **Jackson MJ, Jackson MJ, McArdle F, Storey A, Jones SA, McArdle A, Rhodes LE.** Effects of micronutrient supplements on u.v.-induced skin damage. *Proc Nutr Soc*, **2002**; 61(2):187-189.
68. **. Mathers AR, Larregina AT.** Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunol Res*, **2006**; 36(1-3):127-136.
69. **Baumann L.** Skin ageing and its treatment. *J Pathol*, **2007**; 211(2):241-251.
70. **Naylor MF, Boyd A, Smith DW, Cameron GS, Hubbard D, Neldner KH.** High sun protection factor sunscreens in the suppression of actinic neoplasia. *Arch Dermatol*, **1995**; 131(2):170-175.

71. **Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C.** Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol*, **2008**; 43(11):986-997.
72. **Baumann L.** Skin ageing and its treatment. *J Pathol*, **2007**; 211(2):241-251.
73. **Richelle M, Sabatier M, Steiling H, Williamson G.** Skin bioavailability of dietary vitamin E, carotenoids, polyphenols, vitamin C, zinc and selenium. *Br J Nutr*, **2006**; 96(2):227-238.
74. **Dover JS, Hruza GJ.** Laser skin resurfacing. *Semin Cutan Med Surg*, **1996**; 15(3):177-188.
75. **Biesman BS.** Carbon dioxide laser skin resurfacing. *Semin Ophthalmol*, **1998**; 13(3):123-135.
76. **Bernstein EF, Andersen D, Zelickson BD.** Laser resurfacing for dermal photoaging. *Clin Plast Surg*, **2000**; 27(2):221-240.
77. **Riggs K, Keller M, Humphreys TR.** Ablative laser resurfacing: high-energy pulsed carbon dioxide and erbium:yttrium-aluminum-garnet. *Clin Dermatol*, **2007**; 25(5):462-473.
78. **Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G.** Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging*, **2006**; 1(4):327-348.
79. **Gonzaga ER.** Role of UV light in photodamage, skin aging, and skin cancer: importance of photoprotection. *Am J Clin Dermatol*, **2009**; 10(1):19-24.
80. **Limpiangkanan W, Limpiangkanan W.** Photo-aging: a literature review. *J Med Assoc Thai*, **2010**; 93(6):753-757.
81. **Laughrea M.** On the error theories of aging. A review of the experimental data. *Exp Gerontol*, **1982**; 17(4):305-317
82. **Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Gaspard U, Piérard GE.** Skin climacteric aging and hormone replacement therapy. *J Cosmet Dermatol*, **2006**; 5(1):3-8.
83. **Vranesić-Bender D.** The role of nutraceuticals in anti-aging medicine. *Acta Clin Croat*, **2010**; 49(4):537-544.
84. **Serafini M, Del Rio D.** Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report*, **2004**; 9(3):145-152.
85. **Halliwell B.** Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, **1995**; 49(10):1341-1348.
86. **Peterson SV, Enghild JJ.** Extracellular superoxide dismutase: structural and functional considerations of a protein shaped by two different disulfide bridge patterns. *Biomed Pharmacother*, **2005**; 59(4):175-182.
87. **Fang YZ, Yang S, Wu G.** Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, **2002**; 18(10):872-879.
88. **Leopold JA, Loscalzo J.** Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler thromb Vasc Biol*, **2005**; 25(7):1332-1340.
89. **Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE, Loscalzo J.** Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J Biol Chem*, **2004**; 279(26):26839-26845.
90. **Bompard GJ, Prevot DS, Bascand JL.** Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and s-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin Biochem*, **1990**; 23(6):501-504.
91. **Akyol Ö.** Oxidative stress in schizophrenia. *The Medical Journal of Kocatepe*, **2004**; ek sayı:15-25.

92. **Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H.** Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol*, **1987**; 32(17):2529-2534.
93. **Talwar DK.** Biological variation of vitamin in blood of healthy individuals. *Clinical Chemistry*, **2005**; 51(11):240-246.
94. **Ihara H.** Stability of fat-soluble and water-soluble vitamins in artificially prepared, vitamin enriched, lyophilized serum. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **2004**; 18(4):240-246.
95. **Burtis CA, Ashwood ER.** *Tietz fundamental of clinical chemistry*. 2nd Ed. USA Saunders Company, **1994**: 251-258.
96. **Rose RC, Bode AM.** Biology of free radical scavengers an evaluation of ascorbate. *FASEB J*, **1993**; 7(12):1135-1142.
97. **Robert FC.** Vitamin C: The nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. *Medical Hypotheses*, **1985**; 18(1):61-77.
98. **Traber MG.** Utilization of vitamin E. *Biofactors*. **1999**; 10(2-3):115-120.
99. **Schneider C.** Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res*, **2005**; 49(1):7-30.
100. **Burton G, Joyce W, Ingold K.** Is vitamin E the only lipid soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Arc Biochem Biophys*, **1983**; 221(1):281-290.
101. **Van Haften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A.** Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metabolism Reviews*, **2003**; 35(2-3):215-253.
102. **Bahattacharya CG.** A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. *Biometrics*, **1967**; 23(1):115-135.
103. **Mascio DP, Murphy ME, Sies H.** Antioxidant defense systems: the role of carotenoids tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr*, **1991**; 53(S1):194-200.
104. **Bohles H.** Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Int J Vitam Nutr Res*, **1997**; 67(5):321-328.
105. **Jain SK, Lim G.** Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺ + K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose- human erythrocytes. *Free Radic Biol Med*, **2001**; 30(3):232-237.
106. **Helmrich A, Barnes D.** Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*, **1998**; 57:3-17.
107. **Stulberg CS, Coriell LL, Kniazeff AJ, Shannon JE.** The animal cell culture collection. *In Vitro*, **1970**; 5:1-16.
108. Genetic Reprograming Group. Group-Cell and tissue culture laboratory-Protocols-NT donor cells. Erişim: <http://www.abc.hu/dinnyes/ntdonorcells.htm>. Erişim Tarihi: 11.03.2012
109. **Perlman D.** Value of mammalian cell culture as a biochemical tool. *Science*, **1968**; 160(3823):42-46.
110. **Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gómez-Lechón MJ.** Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab*, **2008**; 9(1):1-11.
111. **Baserga R, Wiebel F.** The cell cycle of mammalian cells. *Int Rev Exp Pathol*, **1969**; 7:1-30.
112. **Thomas DB.** Regulation of the mammalian cell cycle in vitro? *Biochem Soc Trans*, **1977**; 5(6):1801-1808.

113. **Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollefsbol TO.** Aging cell culture: methods and observations. *Methods Mol Biol*, **2007**; 371:9-19.
114. **Scherer WF, Syverton JT.** The viral range in vitro of a malignant human epithelial cell (strain HeLa, Gey). II. Studies with encephalitis viruses on the Eastern, Western, West Nile, St. Louis, and Japanese B types. *Am J Pathol*, **1954**; 30(6):1075-1083.
115. **Hof JO.** Human cells in culture: revisited. *S Afr Med J*, **1972**; 45(24):672-674.
116. **Oka MS, Rupp RG.** Large-scale animal cell culture: a biological perspective. *Bioprocess Technol*, **1990**; 10:71-92.
117. **Marx U.** Trends in cell culture technology. *Adv Exp Med Biol*, **2012**; 745:26-46.
118. **Mather JP.** In vitro models. *Stem Cells*, **2012**; 30(2):95-99.
119. **Petricciani J, Sheets R.** An overview of animal cell substrates for biological products. *Biologicals*, **2008**; 36(6):359-362.
120. **Hemphill JJ, Herman YF, Young VM.** Comparative antifungal activity of nystatin and amphotericin B in tissue culture for virus propagation. *Antibiot Annu*, **1957-1958**; 5:961-966.
121. **Littlefield JW.** Control mechanisms in animal cell cultures. *Arch Biochem Biophys*, **1968**; 125(2):410-415.
122. **Delalle-Lozica N.** Local therapy as basic anti-aging prevention. *Acta Clin Croat*, **2010**; 49(4):529-536.
123. **Hsu S.** Green tea and the skin. *J Am Acad Dermatol*, **2005**; 52(6):1049-1059.
124. **Vassale C, Petrozzi L, Btto N, Andreassi MG, Zucchelli GC.** Oxidative stress and its association with coronary artery disease and different atherogenic risk factors. *J Intern Med*, **2004**; 256(4):308-315.
125. **Zima T, Stipek S, Tesar V, Nemecek K, Mechurova A.** Free radicals in the pathogenesis of selected diseases. *Cas Lek Cesk*, **1995**; 134(10):291-295.
126. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, **1961**; 193(1):265-275.
127. **Atlan N, Dincel AS, Koca C.** Diabetes mellitus and oxidative stress. *Turk J Biochem*, **2006**; 31(2):51-56.
128. **Kuhn MA.** Oxygen free radicals and antioxidants. *Am J Nurs*, **2003**; 103(4):58-62.
129. **Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T.** Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radical Research*, **2006**; 40(5):495-505.
130. **Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P.** Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*, **1997**; 43(4):562-568.
131. **Gouado I, Mbiapo TF, Moundipa FP, Teugwa MC.** Vitamin A and E status of some rural populations in North of Cameroon. *Int J Vitam Nutr Res*, **1998**; 68(1):21-25.
132. **Yu BP.** Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mech Ageing Dev*, **1999**; 111(2-3):73-87.
133. **Hunt KJ, Hung SK, Ernst E.** Botanical extracts as anti-aging preparations for the skin: a systematic review. *Drugs Aging*, **2010**; 27(12):973-985.
134. **Yamada M, Uda Y, Tanigawara Y.** Mechanism of enhancement of Percutaneous Absorption of molsidomine by Oleic Acid. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **1987**; 35(8): 3399-3406.
135. **(Wester RC, Noonan PK.** Relevance of Animal Models For Percutaneous Absorption. *International Journal of Pharmaceutics*, **1980**; 7: 99-110.)
136. **Smith JR, Lincoln DW 2nd.** Aging of cells in culture. *Int Rev Cytol*, **1984**; 89:151-177.

137. **Reff M, Schneider EL.** Cell culture aging. *Mol Cell Biochem*, **1981**; 36(3):169-176.
138. **Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC.** Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol*, **2001**; 44(1):1-11.
139. **Yu BP.** Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mech Ageing Dev*, **1999**; 111(2-3):73-87.
140. **Glaser DA.** Anti-aging products and cosmeceuticals. *Facial Plast Surg Clin North Am*, **2004**; 12(3):363-372.
141. **Buckingham EM, Klingelhutz AJ.** The role of telomeres in the ageing of human skin. *Exp Dermatol*, **2011**; 20(4):297-302.
142. **Ma W, Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, Schüller J, Scharffetter-Kochanek K.** Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clin Exp Dermatol*, **2001**; 26(7):592-599.
143. **Podda M, Grundmann-Kollmann M.** Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol*, **2001**; 26(7):578-582.
144. **Miyachi Y.** Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci*, **1995**; 9(2):79-86.
145. **Morré DM, Lenaz G, Morré DJ.** Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol*, **2000**; 203(10):1513-1521.
146. **Pinnell SR.** Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med*, **1985**; 58(6):553-559.
147. **Chiu PY, Leung HY, Ko KM.** Schisandrin B Enhances Renal Mitochondrial Antioxidant Status, Functional and Structural Integrity, and Protects against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Biol Pharm Bull*, **2008**; 31(4):602-605.
148. **Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L.** The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol*, **2001**; 29:26-42.
149. **Gallardo V, Muñoz M, Ruíz MA.** Formulations of hydrogels and lipogels with vitamin E. *J Cosmet Dermatol*, **2005**; 4(3):187-192.
150. **Weinstein GD, Nigra TP, Pochi PE, Savin RC, Allan A, Benik K, Jeffes E, Lufrano L, Thorne EG.** Topical tretinoin for treatment of photodamaged skin. A multicenter study. *Arch Dermatol*, **1991**; 127(5):659-665.
151. **Shapiro SS, Mott DJ.** Modulation of glycosaminoglycan biosynthesis by retinoids. *Ann NY Acad Sci*, **1981**; 359:306-321.
152. **Masaki H.** Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci*, **2010**; 58(2):85-90.
153. **Girotti AW, Kriska T.** Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal*, **2004**; 6(2):301-310.
154. **Al-Bader T, Byrne A, Gillbro J, Mitarotonda A, Metois A, Vial F, Rawlings AV, Laloëuf A.** Effect of cosmetic ingredients as anticellulite agents: synergistic action of actives with in vitro and in vivo efficacy. *J Cosmet Dermatol*, **2012**; 11(1):17-26.
155. **Tomankova K, Kejlova K, Binder S, Daskova A, Zapletalova J, Bendova H, Kolarova H, Jirova D.** In vitro cytotoxicity and phototoxicity study of cosmetics colorants. *Toxicol In Vitro*, **2011**; 25(6):1242-1250.
156. **Stowe CB.** The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Complement Ther Clin Pract*, **2011**; 17(2):113-115.