

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

**TÜRKİYE PİYASASINDAKİ ANTI-AGING
PREPARATLARIN DERİ FİBROBLAST HÜCRE
KÜLTÜRÜ KULLANILARAK ANTIOKSİDAN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Arş. Gör. Mehmet BERKÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN

MERSİN – 2012

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

**TÜRKİYE PİYASASINDAKİ ANTI-AGING
PREPARATLARIN DERİ FİBROBLAST HÜCRE
KÜLTÜRÜ KULLANILARAK ANTIOKSİDAN
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Arş. Gör. Mehmet BERKÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN

Tez No: 212

MERSİN – 2012

MERSİN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Türkiye Piyasasındaki Anti-Aging Preparatların Deri Fibroblast Hücre Kültürü Kullanılarak Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi 11/06/2012

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Ebru DERİCİ EKER

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Serap YALIN

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 20/06/2012 tarih ve 2012/123 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU



TEŞEKKÜR

Farmasötik Teknoloji eğitimim süresince ve bu tezin oluşma aşamasında daima yanımda olup bilgisini, tecrübesini, bilimsel desteğini, sabrını ve anlayışını eksik etmeyen değerli hocam ve danışmanım Sn. Doç. Dr. Nefise Özlen ŞAHİN'e,

Manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim başta Sn. Yrd. Doç. Dr. Altan YÜKSEL ve Sn. Yrd. Doç. Dr. Ebru DERİCİ EKER olmak üzere tüm Eczacılık Teknolojisi Bölümü öğretim elemanlarına,

Biyokimyasal parametrelerin bakılması sırasında göstermiş olduğu katkı ve yardımlarından dolayı Sn. Doç. Dr. Serap YALIN'a,

Tezimde kullandığım anti-aging kremlerin mikroskobik incelenmesi sırasında laboratuvar imkânlarından yararlanmaya izin vererek göstermiş olduğu katkılardan dolayı Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarına,

Ve son olarak bugünlere gelmemde en büyük desteği sağlayan AİLEME sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Arş. Gör. Mehmet BERKÖZ

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Deri	5
2.1.1. Derinin Yapısı ve Genel Düzenlenmesi	6
2.1.1.1. Epidermis	7
2.1.1.1.1. Keratinositler	7
2.1.1.1.1.1. Bir keratinositin farklılaşması	8
2.1.1.1.2. Melanositler	9
2.1.1.1.3. Langerhans hücreleri (dendritik hücreler)	9
2.1.1.1.4. Merkel hücreleri	10
2.1.1.2. Dermis	10
2.1.1.2.1. Damarlanma	11
2.1.1.2.2. Duyu reseptörleri	11
2.1.1.3. Hipodermis	13
2.1.4. Deri Ekleri	13
2.1.4.1. Kıllar	13
2.1.4.2. Bezler	15
2.1.4.2.1. Ter bezleri	15
2.1.4.2.2. Sebace bezleri	17
2.1.4.3. Tırnaklar	17
2.2. Deri Yaşlanması	18

2.2.1. Deri Yaşlanmasının Çeşitleri	19
2.2.1.1. Kronolojik Yaşlanma	19
2.2.1.2. Foto yaşlanma	20
2.2.2. Yaşlanmış Derinin Histolojik Özellikleri	22
2.2.2.1. Epidermis	22
2.2.2.2. Dermis	23
2.3. Anti-aging Tedavi Yöntemleri	24
2.3.1. Farmakolojik Ajanlar	24
2.3.1.1. Güneşten koruyucular	24
2.3.1.2. Hidrokinon	25
2.3.1.3. Retinoidler	26
2.3.1.4. Antioksidanlar	27
2.3.1.4.1. E Vitamini (α - tokoferol)	27
2.3.1.4.2. C Vitamini (Askorbik asit)	28
2.3.1.4.3. Selenyum	28
2.3.1.4.4. Çinko	29
2.3.1.4.5. Melatonin	29
2.3.1.4.6. Yeşil çay	29
2.3.1.4.7. N-Furfuriladenin e (Kineraz)	30
2.3.2. Cilt Soyma (Peeling)	30
2.3.3. Lazer Uygulamaları	31
2.3.4. Dolgu Maddeleri	31
2.3.5. Botoks	32
2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller	32
2.4.1. Serbest Radikaller	33
2.4.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri	34
2.4.1.2. Lipit Peroksidasyonu	36
2.4.1.2.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması	36
2.4.1.2.2. Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları	37
2.4.1.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Hasarının Dokular Üzerine Etkileri	38
2.4.2. Antioksidanlar	39

2.4.2.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar	40
2.4.2.1.1. Süperoksit Dismutaz	40
2.4.2.1.2. Glutasyon Peroksidaz	41
2.4.2.1.3. Glutasyon Redüktaz	41
2.4.2.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST)	42
2.4.2.1.5. Katalaz	43
2.4.2.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar	43
2.4.2.2.1. Antioksidan Vitaminler	43
2.4.2.2.2. Albümin	45
2.4.2.2.3. Bilirubin	46
2.4.2.2.4. Transferin ve Laktoferrin	46
2.4.2.2.5. Serüloplazmin	46
2.4.2.2.6. Ürik Asit	46
2.5. Hücre Kültürü	47
2.5.1. Primer Hücre Kültürü	47
2.5.2. Diploid Hücre Kültürü	48
2.5.3. Devamlı Hücre Kültürleri	49
2.5.4. Hücre Kültürlerinin Yapılması	50
2.5.4.1. Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazları	50
2.5.4.1.1. Ayrılma Fazı (Dispersiyon)	50
2.5.4.1.2. Yapışma Fazı	51
2.5.4.1.3. Çoğalma Fazı	51
2.5.4.1.4. Dejenerasyon Fazı	52
2.5.5. Hücre Kültürünün Hazırlanması	52
2.5.5.1. Eksplant Metodu	52
2.5.5.2. Fiziksel Ayrıştırma	54
2.5.5.3. Enzimatik Ayrıştırma	54
2.5.6. Kültürleri Yapılan Hücrelerin Üretilmesi	55
2.5.7. Kültürde Hücrelerin Gelişimini Etkileyen Faktörler	57
2.5.7.1. Sıcaklık	57
2.5.7.2. Osmatik Basınç	58
2.5.7.3. Hidrojen İyonu Konsantrasyonu (pH)	58

2.5.7.4. Diğer Organik İyonlar	59
2.5.7.5. Temel Metabolitler	60
2.5.7.5.1. Karbonhidratlar	60
2.5.7.5.2. Gazlar	60
2.5.7.5.3. Aminoasitler	60
2.5.7.5.4. Vitaminler	60
2.5.7.5.5. Proteinler ve Peptidler	61
2.5.7.6. Destekleyici Proteinler	61
2.5.7.6.1. Aminoasitler	61
2.5.7.6.2. Vitaminler	62
2.5.7.6.3. Nükleozitler	62
2.5.7.6.4. Peptidler ve Ara Maddeler	62
2.5.7.6.5. Hormonlar	62
2.5.7.7. Enzimler	63
2.5.8. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler	63
2.5.8.1. EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)	64
2.5.8.2. Serum	64
2.5.8.3. Hapes	66
2.5.8.4. De-İyonize Su	66
2.5.8.5. Dengeli Tuz Solüsyonu	67
2.5.8.6. Fenol Red	67
2.5.8.7. Antibiyotikler	68
2.5.8.7.1. Penisilin	69
2.5.8.7.2. Streptomisin	69
2.5.8.7.3. Gentamisin	69
2.5.8.7.4. Diğer antibiyotikler	70
2.5.8.7.5. Antimikotikler	70
2.5.9. Besiyerleri ve Hücre Kültürlerine Mikrobiyal Kontaminasyon Açısından Çeşitli Kontrol Testlerinin Uygulanması	70
2.5.10. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Kriyoprezervasyon Yöntemleri	71
2.5.10.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözünmesi	74

2.5.10.2. Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi	74
2.5.10.3. Dondurma İşleminde Dikkat Edilmesi	
Gereken Hususlar	75
2.5.10.4. Sıvı Azot Tankları	75
2.5.11. Kültüre Edilmiş İnsan Hücrelerinin Avantaj ve Dezavantajları	76
2.5.12. Kültüre Hücreler ile Biyokimyasal Ölçümler	77
2.6. Deri Yaşlanması ve Anti-aging Araştırmalarında in vitro Modellerin Kullanılması	78
3. GEREÇ ve YÖNTEM	79
3.1. Gereç	79
3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	79
3.1.2. Çalışmalarda Kullanılan Diğer Sarf Malzemeleri	80
3.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	81
3.1.4. Hücre Dizileri	82
3.1.5. Çalışmada kullanılan Anti-aging Kremler	83
3.1.5.1. Çalışmada Kullanılan Anti-aging Kremlerin İçerikleri	83
3.2. Yöntem	85
3.2.1. Kremlerde Yapılan Fiziksel İncelemeler	85
3.2.1.1. Kremlerde pH Ölçümü	85
3.2.1.2. Viskozite Ölçümü	86
3.2.1.3. Emülsiyon Tiplerinin Belirlenmesi	86
3.2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	86
3.2.2.1. Hücre Kültürü için Sterilizasyon	86
3.2.2.2. Hücre Kültürüne Uygulanacak Anti-aging Kremler için Yapılan Önlemler	87
3.2.2.3. Hücre Dizileri ve Kültür Aşaması	87
3.2.2.4. Hücrelerin Deney için Hazırlanması	88
3.2.3. Hücre Canlılığının Tespiti	88
3.2.4. Hücre Homojenizatının Hazırlanması	89
3.3.5. Hücre Kültüründe Biyokimyasal Ölçümler	89

3.3.5.1. Protein Ölçümü (Lowry Metodu)	89
3.3.5.2. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini	91
3.3.5.3. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini	92
3.3.5.4. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	93
3.2.6. İstatistiksel Yöntem	94
4. BULGULAR	95
4.1. pH Ölçümleri	95
4.2. Viskozite Ölçümleri	95
4.3. Emülsiyon Tiplerinin Belirlenmesi	95
4.4. Fibroblast Hücrelerinde Sağkalım Oranları	98
4.5. Fibroblast Hücrelerinde Katalaz Aktiviteleri	104
4.6. Fibroblast Hücrelerinde SOD Aktiviteleri	105
4.7. Fibroblast Hücrelerinde MDA Düzeyleri	106
5. TARTIŞMA	108
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	121
7. KAYNAKLAR	122
ÖZGEÇMİŞ	135

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Deri dokusunun histolojik yapısı	5
Şekil 2.2. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları	34
Şekil 2.3. Serbest radikallerin oluşma yolları ve yapmış olduğu DNA hasarı	38
Şekil 2.4. Glutasyon döngüsü	42
Şekil 2.5. Fare embiyonik fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü	49
Şekil 4.1. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N1 kodlu antiaging kremimine ait fotogram	96
Şekil 4.2. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N2 kodlu antiaging kremimine ait fotogram	96
Şekil 4.3. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N3 kodlu antiaging kremimine ait fotogram	97
Şekil 4.4. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N4 kodlu antiaging kremimine ait fotogram	97
Şekil 4.5. 24. saatin sonunda kontrol grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	98
Şekil 4.6. 24. saatin sonunda N1 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	99
Şekil 4.7. 24. saatin sonunda N2 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	99
Şekil 4.8. 24. saatin sonunda N3 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	100
Şekil 4.9. 24. saatin sonunda N4 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	100
Şekil 4.10. 48. saatin sonunda kontrol grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	101
Şekil 4.11. 48. saatin sonunda N1 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	101
Şekil 4.12. 48. saatin sonunda N2 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	102

Şekil 4.13. 48. saatin sonunda N3 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	102
Şekil 4.14. 48. saatin sonunda N4 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü	103
Şekil 4.15. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki canlılık oranları	104
Şekil 4.16. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki katalaz aktiviteleri	105
Şekil 4.17. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki SOD aktiviteleri	106
Şekil 4.18. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki MDA düzeyleri	107

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Derideki kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma arasındaki farklılıklar	21
Çizelge 2.2. Organizmada serbest radikal oluşma yolları	35
Çizelge 2.3. Patolojik olarak önemli oksijen türevleri	35
Çizelge 2.4. Serbest radikallerin neden olduğu başlıca hastalıklar	39
Çizelge 3.1. Lowry yöntemine göre protein miktar tayini deneyinin prosedürü	90
Çizelge 3.2. MDA miktar tayini deneyinin prosedürü	94
Çizelge 4.1. Piyasadan temin edilen kremlerinin pH değerleri	95
Çizelge 4.2. Piyasadan temin edilen kremlerinin viskozite değerleri (cP)	95

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A.B.D.	Amerika Birleşik Devletleri
AHA	α -hidroksi asit
BAC	Benzalkonyum klorür
BHA	β -hidroksi asitler
BSA	Bovin serum albumin
BSS	Dengeli tuz çözeltisi
BTX	Botoks
CAT	Katalaz
CP	Centipoise
CSP	Hücre yüzey proteini
Cu-Zn SOD	Bakır-çinko süperoksit dismutaz
DEB	Dermoepidermal bileşke
DMDM Hidantoin	1,3-Dimetilol-5,5-dimetil hidantoin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOPA	3,4-dihidroksifenilalanine
EBSS	Earle'in dengeli tuz çözeltisi
EDTA	Etilen diamin tetraastik asit
EMEM	Eagle's minimal essential medium
FBS	Fetal bovin serum
FCS	Fetal calf serum
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GMP	İyi üretim uygulamaları
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon S Transferaz

HBSS	Hank'ın dengeli tuz çözeltisi
HEPES	2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-yl]etanesülfonik asit
IL	İnterlökin
LD50	Lethal (öldürücü) doz
LETS	Large External Transformation Substrate
LH	Lüteinleştirici hormon
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
MDA	Malondialdehit
MHC	Temel Doku Uygunluk Kompleksi
MMP	Matriks metalloproteinaz
Mn SOD	Manganez Süperoksit dismutaz
NADPH	Nikotinamid adenine dinukleotid fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolium
PCA	Pirrolidon karboksilik asit
PDGF	Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PEG	Polietilen glikol
PPG	Polipropilen glikol
PVM/MA	Polivinil metil eter-maleik anhidrit
RDA	Önerilen günlük kullanım
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s/y	Su/yağ (yağ içinde su dispersiyonu)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SE	Kendiliğinden emülsifiye olabilen
SH	Sülfidril
SLM	Sabouraud'un sıvı besiyeri
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
SPSS	Sosyal bilimler için istatistik paketi
TBA	Tiyobarbütirik asit
TCA	Trikloro asetik asit

TIMMP	Matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri
TNF	Tümör nekroz faktörü
UV	Ultraviyole
UV-A	Ultraviyole-A
UV-B	Ultraviyole-B
y/s	Yağ/su (su içinde yağ dispersiyonu)

ÖZET

Türkiye Piyasasındaki Anti-Aging Preparatların Deri Fibroblast Hücre Kültürü Kullanılarak Antioksidan Etkilerinin İncelenmesi

Deri yaşlanması, derinin fonksiyon ve görüntüsünü etkileyen, sinsi ve progresif seyreden dejeneratif bir süreçtir. Deride oluşan yaşlanma belirtilerini azaltmak için çeşitli topikal anti-aging preparatlar formüle edilmiştir. Bu preparatların etkinlik ve toksisite çalışmaları, genellikle in vivo ortamda gerçekleştirilmekte olup, bu durum pek çok etik tartışmaları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle özellikle son yıllarda kozmesötik ürünlerin etkinlik ve toksisite çalışmalarında in vitro ve ex vivo yöntemlere yöneliş vardır. Bu çalışmada, Türkiye piyasasında yer alan anti-aging preparatların etkinliğinin fare embriyonal fibroblast hücreleri kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, sektörde lider olan kozmetik firmalarının ürünü olan 4 adet anti-aging krem kullanmış olup bu kremlere randomize olarak 1'den 4'e kadar (N1-N4) numaralar verilmiştir. Yaptığımız çalışmada öncelikle bu kremlerin viskozite, pH ve emülsiyon tipi gibi fiziksel özelliklerine bakılmıştır. Daha sonra bu kremler fibroblast hücrelerine uygulanmış ve 24. ve 48. saatin sonunda antioksidan düzeyin belirlenmesi amacıyla süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz aktivitelerine, lipid peroksidasyonunun belirlenmesi için ise MDA düzeylerine bakılmıştır. Ayrıca hücreler tripan mavisi ile boyanarak yüzde canlılık oranlarına bakılmıştır.

Yapılan fiziksel incelemeler sonucunda tüm kremlerin y/s tipi emülsiyon olduğu, pH'larının derinin fizyolojik pH'sı olan 5,5-6,5 arasında yer aldığı ve viskozitelerinin gece kremlerinde yüksek, gündüz kremlerinde ise düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Hücre kültürü uygulamasından sonra krem uygulanan tüm gruplarda MDA düzeylerinin azaldığını, katalaz düzeylerinin ise arttığını tespit etmemize rağmen, içeriğinde A, C ve E vitaminleriyle antioksidan özellikteki bitki ekstraktlarını bulunduran N4 kodlu anti-aging kremin uygulandığı hücrelerde MDA düzeyindeki düşüşün ve katalaz aktivitesindeki artışın en fazla olduğunu belirledik. SOD aktivitesinde ise hiçbir grupta anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Antioksidan vitaminleri içermeyen N1 ve N2 kodlu kremlerde ise MDA düzeyindeki azalma ve katalaz düzeyindeki artış en azdı. Katalaz aktivitesindeki artış ile MDA düzeyindeki düşüş, inkübasyon süresine bağlı olarak artmaktaydı. Krem uygulanan tüm gruplarda, hücre canlılık oranları azalmaktaydı ancak bu azalmanın en fazla olduğu grubun, en fazla koruyucu içeren N4 kodlu kremin uygulandığı grup olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, fibroblast hücre kültürü tekniği, anti-aging kozmetik ürünlerin etkinlik ve güvenlik testleri için önerilebilir. Bu da etik problemleri ortadan kaldırdığı gibi deney hayvanlarından kaynaklanan problemlerin önüne geçilmesini sağlamaktadır. Ayrıca, bu şekilde elde edilen sonuçların doğrudan insanlara yansıtılması açısından da oldukça faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Hücre kültürü, fibroblast, deri yaşlanması, kozmesötik, oksidatif stres

ABSTRACT

Investigations On Antioxidant Effects of Anti-aging Cosmetic Products In Turkish Market Using Skin Fibroblast Cell Culture

Skin aging is an insidious, progressive and degenerative process, influencing the function and appearance of skin. In order to minimize symptoms of aging, various topical anti-aging preparations have been formulated over the years. Efficacy and toxicity studies of these preparations are usually carried out under *in vivo* conditions. However, it raises ethical discussions. Therefore, recently, a significant trend has appeared in using *in vitro* and *ex vivo* methods for testing efficacy and safety of cosmeceutic products. In this study, it was aimed to investigate the efficacy of anti-aging products in Turkish market, employing mouse embryonal fibroblast cell culture technique.

In this study, four anti-aging creams of leading companies were selected from Turkish market to be tested for efficacy. They were randomly numbered from 1 to 4 (N1-N4). Initially, some physical properties such as viscosity, pH, and emulsion type of these samples were investigated. Afterwards, they were applied to the fibroblast cells. In the end of 24. and 48. h incubation periods, superoxide dismutase (SOD) and catalase activities were investigated to determine antioxidant levels as well as MDA levels were found to determine lipid peroxidation. Furthermore, percent viability rate of fibroblast cells were measured following trypan blue dye exclusion test.

As a result of physical characterizations, it was determined that all creams undergone investigation were oil-in-water type of emulsions with pH values falling into the range of physiological pH of skin (5.5-6.5) and viscosity values higher for night creams, lower for day creams. Following the cell culture application, in all groups treated with creams, MDA levels decreased whereas catalase activities increased. In the cells treated with the product encoded as N4, which contains vitamins A, C, and E as well as plant extracts with significant antioxidant properties, MDA levels showed the highest decrease and the greatest increase was obtained in catalase levels. On the contrary, SOD activity didn't show any significant change at all in any of the groups tested. In the products (N1 and N2) without antioxidant vitamins, decrease in MDA and increase in catalase were at minimum level. Increase in catalase activity and decrease in MDA level were enhanced with increasing incubation period. In all groups treated with creams, cell viability rates seemed to be decreased. However, this decrease was its most significant level in N4 encoded group, which contains the highest amount of preservatives.

In conclusion, fibroblast cell culture technique can be suggested for testing efficacy and safety of anti-aging cosmetic products. This has seemed to overcome ethical problems and avoid animal use for testing. Also, it may be useful in correlating the results to human data.

Keywords: Cell culture, fibroblast, skin aging, cosmeceutics, oxidative stress

1. GİRİŞ

Yaşlanma, genel anlamıyla fizyolojik ve ruhsal fonksiyonların zamanla etkinliğinin giderek azalması sonucu ortaya çıkar. Bilimsel olarak insan ömrünün 120 yıl dolayında olduğu saptanmıştır (1). 20 yaşına kadar vücudumuz gelişir ve en üst seviyeye ulaşır. Bu yaştan sonra, DNA her yıl üretim yeteneğinin yüzde 1'ini kaybeder. Ancak, bu yaşam süresi çeşitli etkenlere bağlı olarak 75-80 yıla kadar düşmektedir. Bu etkenlerden bazıları; çevresel, genetik, hormonal, bağışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem, serbest radikaller ve yaşam biçimi olarak sıralanabilir (1).

Cildin yaşlanması, zamanla ortaya çıkan, iç ve dış pek çok etkenin yol açtığı değişiklikler sonucunda derinin kuru, kırışık ve elastikiyetsiz bir şekil almasıyla gerçekleşir (2). Cildin en dış tabakası epidermistir. Bu tabakanın en altındaki bazal hücreler yeni hücreleri üretir. Yeni hücreler, zamanla yüzeye doğru çıkarak ölür. Genç insanlarda hücre yenileme kapasitesi hızlıdır. Hücre üretimi gençlerde her 28-30 günde bir gerçekleşir. Yaşlandığımızda ise, onarım yeteneği azaldığından bu değişim süreci yavaşlar ve 50 günü bulur. Yaş etkisiyle ortaya çıkan bu olumsuz durum kronolojik yaşlanma olarak adlandırılır (3).

Derinin kırışması ve saçların beyazlamasında genetik faktörlerin yanı sıra, yaşam biçimi, beslenme bozuklukları, sigara tiryakiliği, sigara dumanına maruz kalma (pasif içicilik), uyku düzensizlikleri ve stres de önemli rol oynamaktadır. Cinsiyet hormonları da cildimizin yaşlanmasında rol oynar (4). Östrojen hormonu azlığında, deri hücrelerinin bölünme hızı yavaşlar. Östrojen düzeyinin artması, hücre yenilenmesini hızlandırır. Derinin kollajen liflerinin yoğunluğu östrojen ve progesteron hormonlarına bağımlıdır (5,6).

Kollajen; vücudun önemli proteinlerinden biridir (7). Üç protein zincirinden oluşmaktadır. Bunlar birbirine üçlü heliks şeklinde bağlanmaktadır. Kollajen cildimizin dayanıklılığını, yaşam süresini ve pürüzsüzlüğünü sağlayan önemli bir proteindir (7). Ayrıca, hücrenin şekli, değişimi ve yapısının belirlenmesinde etkin rol oynar. Kollajen derinin %75'ini oluşturur (8). Bunun sonucu olarak; cildimiz pürüzsüz, esnek ve genç görünür. Yüksek kollajen seviyesi, sağlıklı bir cildin oluşmasını sağlar. Östrojen hormonundaki azalma, derideki kollajen sentezini de azaltır. Progesteron hormonu ise, kollajeni yıkan biyokimyasal mekanizmaları durdurur (5,6,9).

Cilt, yaşlanmasını üç safhada gerçekleştirir (10). Birinci evrede; dermal doldurucu (kollajen 1 ve 3) bağları zayıf bir şekilde yenilenmeye başlar. Dermisin, kendine destek veren bu yapıyı kaybetmesi sonucu cilt sarkmaya başlar ve kırışıklıklar daha da derinlere iner. İkinci evrede dermisi oluşturan destek bağları (kollajen 4 ve7) kötüleşir ve kopar. Bu yüzden cildin kütan yapısı sağlamlığını ve desteğini kaybeder. Son evrede ise; cilt, artık, gerekli olan yüzey nemini koruyamaz, kurur, kırışıklıklar belirginleşir ve cilt kendi yaşını göstermeye başlar (10).

Cilt yaşlanması, iki şekilde gerçekleşir (11);

- a. kronolojik yaşlanma
- b. ekstrensek yaşlanma

Ekstrensek yaşlanmada etkili faktörlerden en önemlisi, güneşin zararlı ışınlarıdır. Özellikle “Ultra Violet Aging” (UVA) ışınları ile ortaya çıkan ve ciltte meydana gelen tüm süreçleri olumsuz etkileyen bu durum “foto yaşlanma” olarak tanımlanır (11). UVA, düşük enerji seviyesine sahip cilt yaşlanmasından sorumlu olan mor ötesi ışınlarıdır. D vitamini vücutta üretilmediği için, güneş ışınları yardımıyla deri tarafından sentezlenir. Fakat, bunun için çok kısa bir süre yeterli olmasına rağmen uzun süre güneş ışınlarına maruz kalmak, cilt için önemli risk oluşturur (12). Çünkü; bu zararlı ışınlar kollajen üretimini olumsuz yönde etkileyerek yenilenmeyi yavaşlatırlar ve kollajen yıkımına sebep olan enzimleri aktive ederler. Bunun neticesinde; ciltte ince çizgiler oluşmaya başlar (12). Dünya çapında yılda üç milyondan fazla ölümden sorumlu olan sigara; saç kaybı, psöriyazis, akne oluşumu, melanoma, pullu hücre kanseri, yaraların geç iyileşmesi, erken cilt yaşlanması gibi dermatolojik problemlerin temelindeki sebeplerden biridir (9,13).

Epidemiyolojik çalışmalar, sigara kullanımının erken cilt yaşlanmasında önemli bir çevresel faktör olduğunu göstermiştir (14). Yine bu çalışmalarda sigaranın kollajen üretimini zayıflattığı, matriks metalloproteinaz enzimini (MMP) ve tropoelastinin üretimini arttırdığı, matriks proteinlerini küçülttüğü ve elastinin anormal üretimine sebep olduğu gözlemlenmiştir (15). Sigaranın MMP seviyesini arttırması, proteoglikanların ve kollajenin yıkımına yol açarak dermal bağlantı doku metabolizmasındaki yıkım ve biyosentez arasındaki dengeyi bozmasına sebep olur (16).

Kronolojik yaşlanma ise; genetik değişikliklere bağlıdır (12). Dolayısıyla, bireylerarası farklılıklar arz eder. Kollajen ve elastindeki biyokimyasal değişikliklerden

kaynaklanır. Yaşlanmayla birlikte normal elastin fibrilleri azalır ve kırışıklıklar oluşur. Kollajen fibrilleri kalınlaşır. Halat benzeri demetler halinde dizilir. Fibroblastların biyosentetik kapasitesinde ve sayısında azalma olur. Yetişkin bir kişide, fibroblastların membran lipid içerikleri değişir; fosfatidil kolin ve fosfatidil etanolamin oranları artar. Bunun sonucunda derinin hidrasyonunda azalma ve yaşlanma görülür (12).

Kronik yaşlanmayı açıklayan mekanizmalardan biri serbest radikal teorisi (17). Radikal, bir veya daha fazla sayıda paylaşılmamış elektron içeren bir grup atom veya moleküldür. Bu teoriye göre, intraselüler metabolik yollarda ortaya çıkan serbest radikaller progresif ve kümülatif olarak hücrelerin ve organizmaların fonksiyonunu etkiler. Derinin bağ dokusunda yer alan serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri, lipid peroksidasyonu, DNA proteinlerinde çapraz bağlar, bazı antioksidan enzimlerin inaktivasyonu, polisakkaritlerin polimerizasyonu, proteaz, kollajenaz, elastazların serbestlenmesine sebep olarak deri yaşlanmasını hızlandırır (17).

Hücrelerde bulunan antioksidanlar; yüksek (enzimatik) ve düşük (nonenzimatik) molekül ağırlıklı olarak sınıflandırılır (18). Düşük molekül ağırlığına sahip olan antioksidanlar, organizmada sentezi gerçekleşmeyen askorbik asit ve tokoferol ile organizma tarafından sentezlenen koenzim Q10, glutatyon, polipeptid tioredoksin ve lipoik asittir. Yağda çözünen tokoferol ile koenzim Q10 membranlarda bulunurken suda çözünen askorbik asit ve glutatyon sitoplazmada yer alır. Yüksek molekül ağırlıklı antioksidanlar ise, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazdır. Yaşlanmada yüksek molekül ağırlıklı ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlarda azalma görülür (18).

Cilt yaşlanmasına sebep olan bu etkileri azaltmak, düzeltmek veya önlemek için çeşitli uygulamalar denenmiştir (18). 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, hedeflendirme 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 (18).

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 (19). Etkinlik ve güvenlik çalışmaları, in vivo koşullarda gerçekleştirilmektedir. Bu çalışmaların dizaynı ve gerçekleştirilmesinde etik unsurlar önem kazanmaktadır. Son yıllarda, bilim adamları, kozmetik ürünlerin etkinlik ve güvenlik çalışmalarında kullanılmak üzere alternatif ex vivo yöntemlerin geliştirilmesine yönelmiştir. Hücre kültürü çalışmaları bu alternatiflerin başında gelmektedir (19).

Hücre kültürü çalışmaları, hızlı, spesifik ve etkin sonuçlar vermektedir (20). Günümüzde, klinik çalışmalarda uygulanmaya başlanan bu metotların özellikle kozmetik ürünlerde kullanılması henüz çok yenidir ve ülkemizde bu sektörlerde henüz kullanılmamaktadır (20).

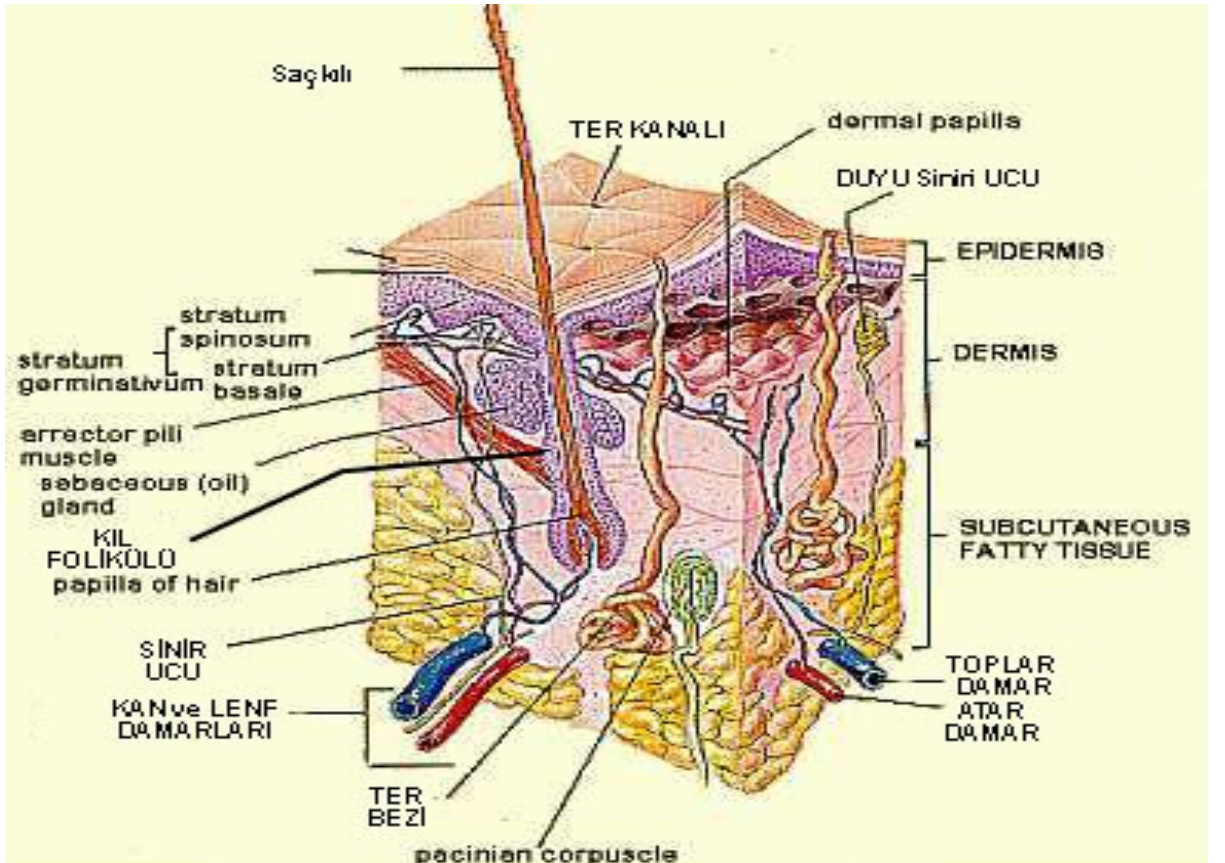
Tüm bunlar göz önüne alınarak tez alışmamızda, Türkiye piyasasında yer alan bazı anti-aging preparatların etkinliğinin test edilmesi hususunda in vivo testlere alternatif oluşturmak üzere, deri fibroblast hücre kültürü tekniği kullanılarak incelenmesine karar verilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Deri, insan ve hayvan organizmalarının dış yüzeyini kaplayan en üst katman olup, altında barındırdığı kas ve organları koruyan ve doku tabakalarından oluşan bir örtü sistemidir (21). Deri dokusunun histolojik yapısı Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Deri, iki bileşenden oluşur (21);

- Deri
- Tırnak, kıl ve bez (ter ve yağ bezleri ile meme bezleri) gibi epidermal türevler.



Şekil 2.1. Deri dokusunun histolojik yapısı (21)

Derinin çeşitli görevleri vardır (21);

- a. Koruma (mekanik görevi),
- b. Su bariyeri görevi,
- c. Vücut ısısının düzenlenmesi (ısı muhafazası ve ısı kaybı),
- d. Özgün olmayan savunma (mikroorganizmalara karşı bariyer görevi),
- e. Tuz atılımı,
- f. D vitamini sentezi,
- g. Duyu algılama.

2.1.1. Derinin Yapısı ve Genel Düzenlenmesi

Deri, birbirine sıkıca bağlı üç tabakadan meydana gelir (21,22);

- a. En dışta, ektoderm kökenli epidermis,
- b. Epidermisin altında mezoderm kökenli dermis,
- c. En altta hipodermis veya subkütanöz tabaka.

Genel olarak, kalın deri ve ince deri olmak üzere iki tip deri vardır (21,22);

Kalın deri, 5 mm'den daha kalındır El ayası ve ayak tabanında bulunur (21,22). Kalın bir epidermis ve dermise sahiptir. İnce deri (1-2 mm kalınlığındadır) vücudun geri kalan bölümlerini örter; burada epidermis incedir.

Deri yüzeyinde oyuklarla ayrılmış dar epidermal çıkıntılar bulunur (21). Parmak uçlarında bu çıkıntılar özel bir şekil oluştururlar. Bunlara ait izler, her bireye özgü parmak izlerini meydana getirir.

Epidermal çıkıntı, epidermisin dermal tarafta yaptığı uzantılardır (21). Burada primer dermal papillalar bulunur. İnterpapiller bir uzantı, primer dermal papillayı iki adet sekonder dermal papillaya ayırır. Dermal papilla, primer ve sekonder dermal papillaları içine alır. Dermal papillalar sayıca çoktur ve dallanmış halde bulunurlar. İnce deride, papillanın derinliği ve sayısı daha azdır (21,22).

2.1.1.1. Epidermis

Epiderminin çok katlı yassı epitel tabakasında dört ayrı hücre tipi bulunur (23);

- a. Hâkim hücre tipi keratinositlerdir. Bu hücreler, başlıca ürünleri olan ara filament proteini keratin nedeniyle bu ismi almışlardır.
- b. Melanositler, melanin üretiminden sorumlu nöral krista kökenli hücrelerdir.
- c. Langerhans hücreleri, kemik iliği kökenli dendritik hücrelerdir. T lenfositlere antijen sunan hücreler olarak görev yaparlar.
- d. Merkel hücreleri, dokunma duyusunda rol alan nöral krista kökenli hücrelerdir.

2.1.1.1.1. Keratinositler

Keratinositler, beş tabaka şeklinde düzenlenmişlerdir (24);

- a. Stratum bazale
- b. Stratum spinosum
- c. Stratum granulosum
- d. Stratum lücidum
- e. Stratum korneum

Stratum spinosum ve stratum bazale birlikte Malpighi tabakasını oluştururlar (25). Stratum bazale veya stratum germinativum bir bazal membran üzerine dizilmiş tek sıralı prizmatik veya yüksek kübik keratinositlerden meydana gelir. Hücre sitoplazmalarında desmozomlarla bağlantılı ara filamentler bulunur. Işık mikroskopunda incelenebilen ara filament demetlerine tonofilaman adı verilir. Hemidesmozomlar ve bunlarla bağlantılı ara filamentler, bazal hücrelerin bazal yüzeylerini bazal membrana bağlarlar (25).

Stratum bazale hücreleri mitozla çoğalırlar (25). Bölünen hücrelerin bir bölümü stratum bazale'nin kök hücre topluluğunu oluştururken, geri kalanları stratum

spinozuma göç ederler ve stratum korneum oluşumuna kadar giden farklılaşma sürecine girerler (25).

2.1.1.1.1. Bir keratinositin farklılaşması

Stratum spinozumdaki keratinositler, yassı poligonal şekilli ve belirgin oval bir çekirdeğe sahip hücrelerdir (26). Sitoplazma içinde lamelli bir yapı bulunduran küçük granüller görülür. Bu granüllere “membran kaplı granül” veya “lamelli cisimcikler” adı verilir. Ara filaman demetleri olan tonofilamentler dikensi görünümlü sitoplazmik çıkıntılar içinde ilerleyerek bir dezmozomun yoğun plağına tutunurlar (26).

Stratum granülozum, birkaç sıralı yassı çekirdekli keratinositlerden meydana gelir (25). Sitoplazmada bir zarla çevrili olmayan düzensiz şekilli tipik keratohiyalin granülleri ve bunlara eşlik eden tonofilamanlar izlenir. İlk olarak stratum spinozumdaki keratinositlerde görülen lamelli cisimcikler, stratum granülozumda sayıca artarlar ve granül içeriği olan glikolipit açilglikozilseramit hücreler arası boşluğa salınırlar. Hücrelerarası aralıkta bu lamelli materyal, çok tabakalı geniş bir kılıf halinde düzenlenir. Bu yapı, bir üst tabaka olan stratum lusidumda keratinositlerin yüzeyini kaplayacaktır. Glikolipit kılıf sayesinde, epidermis su bariyeri özelliği kazanır (25-27).

Stratum lusidum ve stratum korneum, birkaç sıra halinde dizilmiş ve çekirdek içermeyen keratinositlerden meydana gelir (26). Sitoplazmada, transglutaminazlarca katalizlenen bir reaksiyonla filaggrinle birbirlerine çapraz bağlanan keratin ara filamanlarına ait yığınlar bulunur. Keratin-filaggrin kompleksi, hücre zarının hemen altında birikerek, hücre kapsülü olarak adlandırılan boynuzsu bir yapı oluşturur. Hücre dışında, lamelli cisimciklerden salınan lipidler hücre kapsüllerini birbirine bağlayarak birleşik hücre kapsülünü meydana getirir. Birleşik hücre kapsülü, sıvıların hücre zarından geçişini bir sıvı bariyeri oluşturarak engeller (26).

Farklılaşmanın en son noktasında bulunan stratum korneumdaki keratinositler, oldukça dirençli birleşik hücre kapsülü ile çevrelenmiş yassı yapılar şeklindedir (26). Bunlar, epidermis yüzeyinden dökülürler ve alt tabakalardan gelen keratinositler tarafından sürekli olarak yenilenirler. Hücre tabakalarına özgün olarak değişen keratin ekspresyonu, keratinositlerin farklılaşması sırasında gözlenebilir (25,26).

2.1.1.1.2. Melanositler

Melanosit, melanin pigmenti yapmakla görevli, dendritik uzantıları olan, keratinize olmayan bir hücredir (28). Epiderminin stratum bazale tabakasına yerleşmiş hücrelerdir. Melanositler, nöral kristadan göç eden öncü hücreler olan melanoblastlardan köken alırlar (28).

Melanoblastın, melanositlere dönüşmesi, membrana bağlı bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörüyle etkileşime giren kök hücre faktörünün kontrolü altında gerçekleşir (28). Mast hücreleri, primordiyal germ hücreleri ve kan yapıcı kök hücrelerinin gelişimi de kök hücre faktörünün c-kit reseptörüyle olan etkileşimine bağlıdır (28).

Melanositler, gelişmekte olan epidermis içine girerler ve farklılaşmakta olan keratinositlerle herhangi bir dezmozom bağlantısı kurmadan bağımsız hücreler olarak kalırlar (28). Melanositlerin hayat döngüsü, keratinositlerinkinden daha yavaştır. Melanositler, melanin granülleri içinde paketlenmiş olarak melanin üretirler. Bu granüller de, dallanan hücre uzantıları aracılığıyla, sitokrin salınımla komşu keratinositlere aktarılır (22,28).

Melanin, öncelikle Golgi organelinden köken alan membranla çevrili bir premelanozom içinde depolanır (22). Melanin, tirozinaz enzimi etkisiyle tirozinin, 3,4-dihidroksifenilalanine (DOPA) oksidasyonu sonucunda üretilir. DOPA daha sonra melanine dönüştürülür. Melanin böylece, melanositlerin sitoplazmik uzantıları boyunca bulunan olgun melanin granülleri olan melanozomlar içinde birikir. Ortama salınan ve çözünmeyen koyu melanin granüllerini keratinositler alır. Melanositlere ilave olarak, koroid pleksus, retina ve gözün siliyer cisimciğinde de melanin üreten hücreler bulunur. Albinizm, hücrelerin melanin üretememesinden kaynaklanır (22,28).

2.1.1.1.3. Langerhans hücreleri (dendritik hücreler)

Mezenşimal orjinlidir (29,30). Epiderminin tüm tabakaları olmakla beraber, özellikle “spinosum”un üst bölümünde 1868’den beri tanımlanmıştır. Dendritik hücreler, primer immün yanıtta antijen sunucu hücreler arasında en etkili olanlardır. Oldukça heterojen bir grup olup, antijenlerin sunumu ve T hücrelerinin uyarılmasında

rol alırlar. Langerhans hücreleri, epidermisten lenf düğümlerine göç ederek burada MHC I ve MHC II (majör histokompatibilite kompleksi) ile B7 hücre yüzey antijenlerini taşıyan aktif dendritik hücrelere dönüşürler. Aktif dendritik hücreler de, T lenfositleri uyararak onları aktif hale getirirler (29,30).

Melanositler gibi, Langerhans hücrelerinin de stratum spinosumdaki keratinositler arasında uzanan sitoplazmik uzantıları (dendritik hücreler) vardır. Bu uzantılarla keratinositler arasında dezmozomal bağlantı yerine E-kadherin aracılığıyla temas sağlanır. Langerhans hücre çekirdeği çentiklidir ve sitoplazmada tipik çubuk şeklinde granüller (Birbeck veya vermiform granülleri) bulunur (31).

2.1.1.1.4. Merkel hücreleri

Merkel hücreleri, stratum bazalede bulunan ve modifiye keratinositlere benzeyen hücrelerdir (32). Komşu keratinositlere dezmozomlarla bağlı bulunan ve dermisten epidermise uzanan miyelinli afferent sinir lifleriyle irtibatlı mekanoreseptör hücrelerdir. Sinir lifi, epidermisen bazal laminasını geçtikten sonra miyelin kılıfını kaybeder ve plak benzeri bir duyuşal sonlanma şekline dönüşerek, Merkel hücreleriyle temas eden bir sinir plağı oluşturur. Çekirdeğin şekli düzensizdir ve sitoplazmada nörotransmitter içeren çok sayıda granüller bulunur (32).

2.1.1.2. Dermis

Dermis, sınırları belirgin olmayan iki tabakadan meydana gelir (33);

- a. Papillalı tabaka: Epidermisle temasta olan gevşek bağ dokusu (fibroblastlar, kollajen lifler ve ince elastik lifler) yapısındadır
- b. Retiküler tabaka: Kalın kollajen lif demetleri ve kaba elastik lifler içerir.

Kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri, dermisen çeşitli seviyelerinde bulunan epidermal türevleridir. Stratum bazaledeki keratinositlerin bazal yüzlerinde bulunan hemidezmozomlar, epidermisi bazal membrana bağlayıcı filamanlarla; dermisen papillalı tabakasına ise bağlayıcı liflerle bağlarlar. Hemidezmozomların moleküler ve

yapısal bileşenleri, kabarcıklı deri hastalıklarının nedenlerini anlamak açısından oldukça önemlidir (33).

2.1.1.2.1. Damarlanma

Deride birbiriyle bağlantılı üç şebeke bulunur (34);

- a. Subpapiller pleksus: Dermisin papillalı tabakasında seyredir.
- b. Kütanöz pleksus: Dermisin papillalı ve retiküler tabakaları arasındaki sınırdan gözlenir.
- c. Hipodermik veya subkütanöz pleksus: Hipodermiste veya subkütanöz yağ dokusunda bulunur.

Subpapiller pleksus, her bir dermal papilla içine kapiller yumak birimleri gönderir. Subpapiller pleksustaki venöz kan, kütanöz pleksustaki venlere boşalır. Hipodermik ve kütanöz pleksusların dalları, hipodermisin yağ dokusunu, ter bezlerini ve kıl foliküllerinin derin kısımlarını besler. Arteriyel ve venöz dolaşım arasında bulunan arteriyovenöz anastomozlar, retiküler ve hipodermik bölgelerde yaygın olarak bulunur ve vücut ısısının düzenlenmesinde rol oynarlar (16,23,33).

2.1.1.2.2. Duyu reseptörleri

Deride ve diğer organlarda üç tip duyu reseptörü vardır (16);

- a. Eksteroseptör
- b. Proprioseptörler
- c. İnteroseptörler

Eksteroseptörler, dış çevreyle ilgili bilgi sağlarlar. Proprioseptörler, kaslarda (kas içcikleri), tendonlarda ve eklem kapsüllerinde yerleşmişlerdir; vücudun pozisyonu

ve hareketi hakkında bilgi sağlarlar. İnteroseptörler ise vücudun iç organlarından gelen duyusal bilgileri alırlar (16,34).

Duyusal reseptörlerle ilgili diğerk bir sınıflama, reseptörün cevap verdiği uyarı tipine dayanır (16,34);

- a. Mekanoreseptörler
- b. Termoreseptörler
- c. Nosisseptörler.

Mekanoreseptörler, dokuda veya reseptörün kendisinde meydana gelen mekanik deformasyona cevap verirler. Örneğın, gerilme, titreşim, basınç ve dokunma. Mekanoreseptörler, hem eksteroseptörleri hem de proprioseptörleri içerirler (34,35).

Termoreseptörler, sıcak veya soğuşa duyarlıdır. Nosisseptörler (ağrı reseptörleri), ağrılı uyarılara cevap verirler (34). Deri ve subkütanöz doku, dokunma, basınç, sıcak, soğuk ve ağrı gibi uyarılara cevap veren reseptörler içerir (34,35).

En basit mekanoreseptör, miyelin kılıf içermeyen çıplak sinir sonlanmalarıdır. Çıplak sinir sonlanmaları, derinin epidermisinde ve gözün korneasında bulunur; bunlar hafif basınç ve dokunma uyarılarına cevap verirler (34,35).

İkinci mekanoreseptör tipi Merkel diskidir. Dokunma duyusunu ayırt edici olan bu reseptörün sinir sonlanması, epidermisin stratum bazalesinde yerleşik Merkel hücreğine bağılı olan yassı, disk şeklinde bir yapı meydana getirir (34,35).

Üçüncü mekanoreseptör tipi, iki adet kapsüllü cisimcik içerir (34,35);

- a. Meissner cisimciğı
- b. Pacinian cisimciğı.

Meissner cisimciğı dermal papillalarda bulunur ve parmak uçları ile eldeki dokunma reseptörlerinin yarısını oluşturur. Bu reseptör, aktif dokunma sırasında cisimlerin şekil ve kıvamının algılanmasında önemlidir. Pacinian cisimciğı, hipodermiste veya derin dermiste bulunur. Geçici titreşim uyarılarına cevap verir ve derin duyu reseptörü olarak görev yapar (16,34,35).

Dördüncü reseptör tipi, kıl folikülünün kökü ve gövdesi etrafına sarılmış olan ve çok hassas olan kıldaki sinir sonlanmalarıdır. Kılın hareketi, bu reseptörün uyarılması için yeterlidir (34,35).

2.1.1.3. Hipodermis

Hipodermis veya derinin subkütanöz tabakası dermisin derindeki devamıdır (33). Vücuttaki lokalizasyonuna bağlı olarak değişen kalınlıklarda bir tabaka oluşturan, gevşek bağ dokusu ve yağ hücrelerinden meydana gelir. Göz kapakları, klitoris ve penisteki subkütanöz bölümde yağ dokusu bulunmaz (33).

2.1.4. Deri Ekleri

2.1.4.1. Kıllar

Gelişim sırasında, epidermis ve dermis, ter bezleri ve kıl gibi eklerin oluşumu için birbirleriyle etkileşirler (36). Dermal mezodermdeki fibroblastlardan kaynaklanan sinyal molekülleri etkisiyle epidermisin bazal tabakasında hücre topluluğu şeklinde bir kıl folikül taslağı meydana gelir (36).

Bazal epidermal hücre topluluğu, dermise doğru uzanırken dermal fibroblastlar kıl folikül taslağının altında dermal papilla adı verilen bir küçük nodül oluştururlar (37). Dermal papilla kıl folikül taslağının içine doğru ilerler. Buradaki hücreler bölünüp farklılaşarak keratinize kıl gövdesini meydana getirirler. Taslaktaki melanositler de, ürettikleri melanini kıl gövdesine aktarırlar (36,37).

Kıl folikül taslağında foliküller bulbus olarak adlandırılan bir şişkinlik, kök hücreler (klonojenik keratinositler) içerir. Bu hücreler, morfogenetik sinyallere cevap olarak göç edip, kıl gövdesinin, epidermisin ve yağ bezlerinin rejenerasyonu sağlanmasını sağlarlar (36).

İnsan embriyosundaki ilk kıl, “lanugo” olarak adlandırılan ince, pigmentsiz kıllardır (38). Lanugo doğumdan önce dökülür ve “vellus” adı verilen kısa renksiz

kıllarla yer değiştirir. Vellus, daha sonra derinin alın gibi kılsız bölümleri dışında, terminal kıllarla yer değiştirir (38).

Kıl folikülleri sürekli olarak yenilenirler (36). Folikülün büyüme dönemleri anajen, gerileme dönemi katajen, dinlenme dönemi telojen olarak adlandırılır. Kıllar, hemen hemen tüm vücut yüzeylelerinde bulunan uzun keratinize yapılardır. Sadece el ayası, ayak tabanı, el ve ayak parmaklarının yan tarafları, meme uçları, glans penis ve klitoriste bulunmazlar (36,38).

Her bir kıl, iki bölümden oluşur (36);

- a. Kıl folikülü
- b. Kıl gövdesi

Kıl folikülü, epidermisin tübüler bir invajinasyonudur ve kılın büyümesinden sorumludur (36). Kıl bulbusu, invajine olmuş kıl folikülünün en alttaki bölümüdür. Damardan zengin bir bağ dokusu bölümü (dermal papilla), kıl bulbusuna doğru uzanır (36,37).

Kıl folikülü iki kılıfla çevrilidir (36);

- a. Epidermisin bir uzantısı olan dış kök kılıfı
- b. Üç tabaka yumuşak keratinden oluşan iç kök kılıfı.

Kalın kıl gövdesinin enine kesitinde iç içe geçmiş ve keratinize hücrelerden oluşan üç tabaka izlenir (36);

- a. Kütikül
- b. Korteks
- c. Medulla (medulla ince kılda bulunmaz).

Kıl gövdesi, sert keratinden meydana gelir (36). Kıl folikülü, bir bağ dokusu tabakası ile çevrilidir. Erektör pili kası, foliküler bulbusa bağlıdır. Kılın ve iç kök

kılıfının keratinizasyonu, keratojen bölge adı verilen ve olgunlaşan epidermal hücrelerle sert keratin arasında bulunan geçiş bölgesinde meydana gelir. Kılın rengi, kıl gövdesinde bulunan melanin miktarına ve dağılımına bağlıdır. Sarı kılda, çok az melanozom bulunur. Gri kılda, melanosit ve melanin miktarı birlikte az sayıdadır. Kırmızı kılda ise melanin kimyasal olarak farklıdır ve melanozomlar elips şeklinden ziyade daha yuvarlaktır (36,37).

2.1.4.2. Bezler

Deride 3 tip bez bulunur (39):

- a. Yağ bezleri
- b. Ter bezleri (ekrin ve apokrin yağ bezleri)
- c. Meme bezleri'dir.

Yağ bezi, el ayası ve ayak tabanı dışında tüm vücut yüzeyinde yaygın olarak bulunan, basit holokrin alveoler bir bezdir (39). Yağ bezinin salgı bölümü dermiste bulunur, boşaltım kanalı ise kıl folikülünün boynuna açılır. Dudaklarda, ağız köşelerinde, glans peniste, labia minorda ve meme ucunda yağ bezleri, kıllardan bağımsız olarak doğrudan deri yüzeyine açılırlar (39,40).

Yağ bezlerinin salgı bölümü, küçük kanalcıklarla boşaltım kanalına bağlanmış olan asinus gruplarından oluşur (39). Her bir asinus, sayısız küçük lipid damlacıkları içeren multioküler adipositlere benzeyen hücreleri bünyesinde bulundurur. Boşaltım kanalı, epidermisin Malpighi tabakası ve kılın dış kök kılıfıyla devam eden çok katlı yassı epitelle döşelidir. Bezin yağlı salgısı (sebum) kıl ve epidermis yüzeyine salınır (39,40).

2.1.4.2.1. Ter bezleri

İki tip ter bezi vardır (34);

- a. Ekrin (merokrin) ter bezleri
- b. Apokrin ter bezleri

Ekrin ter bezi, vücut ısısının kontrolünde rol oynayan, basit kıvrımlı tübüler bezdir (34). Ekrin ter bezleri, kolinerjik sinirlerle innerve edilir. Ekrin ter bezinin salgı bölümü üç hücre tipi içeren kıvrımlı bir tüptür. Bunlar; açık hücreler, koyu hücreler ve miyoepitelyal hücrelerdir (34,35).

Açık hücreler, birbirlerinden intersellüler kanalcıklarla ayrılmış, bol miktarda mitokondri içeren katlantılı bir bazal bölgeye sahip, bir bazal lamina üzerine oturan ve terdeki su ve elektrolitlerin (başlıca Na⁺ ve Cl⁻) çoğunu salgılayan hücrelerdir (34). Koyu hücreler, açık hücrelerin üzerine otururlar. Bu hücreler, glikoprotein salgırlar. Miyoepitelyal hücreler, bazal lamina ile açık hücreler arasında yer alırlar (34,35).

Ekrin ter bezinin boşaltım kanalı, iki sıralı kübik hücrelerle örtülüdür (34). Bu hücreler aldosteron etkisi altında, NaCl ve su geri emilimi yaparlar. Kistik fibrozisli hastalarda boşaltım kanalında NaCl geri emilimi bozuktur. Kanal, epidermise yaklaştığında sarmal bir yol izler ve deri yüzeyine bir delikle açılır. Epidermis içinde, boşaltım kanalı keratinositlerle çevrilidir (34,35).

Apokrin ter bezleri, kıvrımlı bezlerdir (34). Aksilla, mons pubis ve anal bölgede bulunurlar. Apokrin ter bezleri, ekrin ter bezlerine göre daha büyük salgı asinüsleri içerirler. Salgı bölümleri, dermiste ve hipodermiste lokalizedir. Boşaltım kanalı kıl folikülüne açılır. Ekrin ter bezinde ise epidermise açılır. Apokrin ter bezleri puberteden sonra fonksiyon kazanırlar ve adrenerjik sinirlerle inerve edilirler. Apokrin ter bezlerinin özel iki örneği, dış kulak yolundaki serüminöz bezler ile göz kapaklarının kenarındaki Moll bezleridir. Serüminöz bezler, pigmentli bir lipid olan serümeni üretirler. Bu bezlerin boşaltım kanalları, dış kulak yolunda yağ bezlerinin kanallarıyla birlikte kıl foliküllerine açılır. Moll bezlerinin boşaltım kanalları, göz kapaklarının serbest yüzeyine veya kirpiklere açılır (34,35).

2.1.4.2.2. Sebace bezleri

Sebace bezleri, kıl folikülüyle erektr pili arasına yerleşen çok katlı kübik epitel hücrelerinden kurulmuş keseciklerdir (35). Keseciklerin duvarını oluşturan çok katlı kübik epitelin kese içine en yakın bulunan hücreleri özel bir biçimde yağdan zenginleşirler ve hücre olmaktan çıkıp küçük yağ fıçıkları haline gelirler. Bu değişmeye “hücrenin yağlı dejenarasyonu” denir. Yağlı dejenarasyona uğrayan hücreler daha sonra keseciklerin boşluğuna düşerler ve böylece sebace bezlerinin salgısı olan yağ salgısı hazırlanmış olur (39). Hücrenin tümü yağlanıp hücrenin kendisi salgı maddesi halini alır. Bu tip salgı yapan bezlere “Holokrin bezleri” denir. Kese boşluğuna düşen yağlanmış hücrelerin yerine çok katlı epitel dokunun daha derinindeki hücreler gelir. Onlar da bir süre sonra yağlanıp salgı olarak atılırlar. Sebace bezini oluşturan kesecikler, kısa bir kanalcığın yardımıyla kıl folikülüne açılırlar. Eretr pili kası kasıldığı zaman sebace bezi sıkışır ve içindeki yağ kıl folikülüne, oradan da deri yüzeyine boşaltır (34,39). Sebace bezleri en çok kafa derisinde, yüzde, dış kulak yolunda, burun kenarlarında bulunur. Avuç içi ve ayak tabanında sebace bezlerine rastlanmaz. Sebace bezleri tarafından salgılanan yağa “Sebum” denir. Sebum deriyi ve saçları nemlendirir, bazı bakterileri öldürür ve deriyi bir ölçüde mekanik etkilere karşı dirençli kılar (34,35,39).

2.1.4.3. Tırnaklar

Tırnaklar, el ve ayak parmaklarının terminal falankslarının dorsal yüzünde bulunan sert keratin plaklarıdır (40). Tırnak plağı, yalnızca stratum bazale ve stratum spinozumdan oluşmuş deri yüzeyi olan tırnak yatağını örter (41,42). Tırnak plağı, yapıcı komşu deri epidermisine benzeyen lateral tırnak katlantıları ile çevrilidir. Lateral tırnak kalıntıları zedelendiğinde, inflamatuvar bir olay gelişir. Bu olaya “onikokriptoz” adı verilir ve sıklıkla ayak başparmağı tırnağında, tırnak batması şeklinde izlenir. Tırnak plağının proksimal kenarı, tırnak kökü veya matrikstir. Burada hilal şekilli beyaz lunula bulunur. Tırnak matriksine çok yakın bir bölgede, tırnak maddesinin oluşumundan sorumlu bir epidermis bölümü yer alır. Plağın distal bölümü tırnağın serbest kenarıdır.

Tırnak plağı, kornifiye epitel hücrelere karşılık gelen sert yapılardan oluşur. Tırnak plağının proksimal kenarı eponikium (eponychium) ile örtülüdür. Bu, derinin stratum korneum tabakasından uzanan bir katlantıdır ve “kütikül” olarak adlandırılır. Kütikül kaybı, tırnak plağı distrofilerine kadar giden tırnak matriksinin inflamatuvar ve enfektif olaylarını kolaylaştırır. Tırnak plağının distaldeki serbest kenarı altında, epiderminin stratum korneumu hiponikium (hiponychium) adı verilen kalın bir yapı meydana getirir. Hiponikium, tırnağın matriks yatağını bakteri ve mantarlara karşı korur (34,41,42).

2.2. Deri Yaşlanması

Deri yaşlanması, derinin fonksiyon ve görüntüsünü etkileyen, sinsi ve progresif seyreden dejeneratif bir süreçtir (43). Deri, yaşlanmaya bağlı değişikliklerin görünür olduğu en temel organdır. İnsan derisi diğer tüm organlar gibi kronolojik olarak yaşlanır. Doğal yaşlanma kişinin genetik alt yapısının belirtecidir; 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 (43,44). 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 kadar süredir güneşe maruz kaldığıyla, kişinin deri tipine bağlıdır. Açık havada çalışanlar, sıcak iklimlerde yaşayanlar ve açık tenli kişiler foto yaşlanmadan daha fazla etkilenirler (44).

Deri yaşlanması oldukça kompleks bir süreçtir (43). Patojenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Son yıllarda, kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma ile ilgili hüresel ve moleküler mekanizmalar daha iyi açıklanmaya başlamıştır. Bu bilgiler göstermiştir ki foto yaşlanma ve kronolojik yaşlanmada temel olaylar benzerdir. Bu yeni moleküler bilgiler anti-aging tedavi yaklaşımlarında da gelişmelere ışık tutmuştur (43,45).

2.2.1. Deri Yaşlanmasının Çeşitleri

2.2.1.1. Kronolojik Yaşlanma

Kronolojik deri yaşlanması, diğer bir deyişle intrinsik yaşlanma, deride belirgin morfolojik değişikliklerden çok fonksiyonel değişiklikler ile karakterizedir (46). Klinik ve histolojik görüntüde belirgin bir değişiklik olmasa da derinin maksimum fonksiyon ve kapasitesinde yaşla birlikte belirgin azalma görülür. İntrinsik yaşlanma ile sonuçlanan fonksiyonel azalmalar, keratinosit ve fibroblast proliferasyonu ile 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 (46). Yara iyileşmesi genç erişkinde yaşlı erişkinden % 50 daha hızlıdır. Ayrıca, bariyer fonksiyonu azaldığı için yaşlı bireylerde su kaybı, genç erişkinden çok daha kolay ve fazladır. Keratinositler bariyer oluşturma fonksiyonları dışında yüksek metabolik aktiviteye de sahiptir (47). Sitokin ve büyüme faktörleri salgılayarak derideki diğer hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonunu düzenlerler. Bu anlamda dengeyi sağlamak ve dokudaki hasarı en aza indirmek için, çok sayıda çevresel uyarıya cevap verirler. 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 (47). 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 (46,47).

Hayat boyunca mitokondrial DNA'da meydana gelen mutasyonların yaşlanmaya yol açtığı varsayılmaktadır (48). 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, kırıştığundan 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; derinin kollajen ve glikozaminoglikan içeriğini arttırdığını göstermiştir (46,48).

2.2.1.2. Foto yaşlanma

Foto yaşlanma, tekrarlayan güneş hasarına bağlı olarak deride ortaya çıkan fiziksel ve fonksiyonel değişikliklerdir (46). Ultraviyole (UV) ışınları, derinin erken yaşlanmasına sebep olur. Foto yaşlanmanın derecesi derinin ne kadar ve ne süredir güneşe maruz kaldığıyla, kişinin deri tipine bağlıdır. Kronik güneş hasarına bağlı yaşlanmanın mekanizması tam olarak anlaşılmamakla birlikte son 10 yıldır foto yaşlanmanın moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar artmıştır (46,47,49).

Ultraviyole ışınlarının, insan derisindeki moleküler cevabı reaktif oksijen radikallerinin foto kronolojik üretimi ile başlar (49). UV ışınları hücre yüzey büyüme faktörünü ve sitokin reseptörlerini aktive eder. NADPH oksidazı aktive eder. NADPH oksidaz keratinositlerdeki UV ışınlarına bağlı hidrojen peroksit üretiminde önemli bir enzimdir. UV ışınlarına maruz kalma, reaktif oksijen türevleri oluşumu aracılığı ile kümülatif hasara yol açar. Foto yaşlanmanın görüldüğü deride gözlenen dermal değişiklikler temel olarak matriks metalloproteinazları (MMP) ve MMP doku inhibitörleri (TIMMP) ile regüle edilir. MMP ve TIMMP'ler fibroblast ve makrofajlarda sentezlenir. UV ışınlarının indüklediği MMP, kollajen tip I ve III'ün parçalanmasına yol açar ve dermisen yapısal bütünlüğü bozulur Tamir mekanizmaları çalışmazsa birbirini izleyen UV ışın 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 (49-54).

Derideki pigmentlerin aktinik hasara karşı deriyi koruduğu iyi bilinir (51,52). Açık tenli kişiler esmer tenli kişilere göre UV'den sonra daha çok kızarıyor ve daha az bronzlaşıyorlar. 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 (51). Açık ve koyu tenli kişilerde DNA'nın foto ürünlerinin buldukları derinlikler de farklıdır (51,52). 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 maruz kalınan UV ışınlarının dalga boyu da önemlidir (52). Yaşlanmayla ilişkili ultraviyole etki spektrumuna tam olarak ayırt edilememiştir. Genel olarak UVB'nin daha çok epidermal hasara, UVA'nın ise dermal değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir (51-53). Derideki kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma arasındaki farklılıklar Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Derideki kronolojik yaşlanma ve foto yaşlanma arasındaki farklılıklar (10-12,44-47,50,51,56)

	Kronolojik yaşlanma	Foto yaşlanma
Klinik	Düzgün, lekesiz, elastiklik kaybı	Nodüler, sert, lekeli, ince ve derin kırışıklıklar
Deri çizgileri	Normal geometrik düzende	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
Stratum Korneum	Normal, basket filesi görünümünde	Heterojenite: basket filesi ve kompakt patern
DEB	Rete kaybı, düzleşmesi, densesa reduplikasyonunda azalma	Rete kaybı, düzleşmesi, densesa reduplikasyonunda artma
Dermis	Yok	Belirgin
Grenz zonu	Elastojenezi elastoliz izler (güve yeniği fibriller)	Belirgin elastojenezi 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
İnflamatuar hücre	İnflamasyon bulgusu yok	Perivenüler, histiyositik, lenfositik birikim

2.2.2. Yaşlanmış Derinin Histolojik Özellikleri

2.2.2.1. Epidermis

Yaşlanmaya bağlı görülen değişiklikler dermiste daha belirgin olmakla birlikte epidermiste de değişiklikler görülmektedir (57). Yaşla birlikte stratum korneumun değişmediğini gösteren çalışmaların yanı sıra yaşlanmayla epidermis kalınlığının azaldığını bildiren yayınlar da vardır (57). Yaşlanmış deride bazal tabaka hücrelerinin büyüklüklerinde, morfolojik görüntülerinde değişiklikler gösterilmiştir. Benzer değişiklikler aktinik yaşlanmanın bulunduğu deride daha belirgindir. Kronolojik yaşlanmada stratum corneum nispeten normal görülür. Ancak; korneositlerin yüzey alanlarının artış gösterdiği ve bu nedenle kimyasal maddelerin atılımlarında gecikme olduğu bildirilmektedir (57).

Dermoepidermal bileşkenin (DEB) girintili çıkıntılı olması deriyi mekanik etkilerden korur (57,58). 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 ışıktan 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, morfolojik olarak daha heterojendir. Melanositlerin yaşla birlikte azalmasına bağlı olarak yaşlı bireyler, UV'nin yol açtığı epidermal DNA hasarına karşı daha hassastırlar (23,33,57,58).

Dendritik hücreler doğal ve edinilmiş immün sistem arasında köprü görevi görürler (59,60). Antijenin alınması, işlenmesi ve T hücrelerine sunulmasında görevlidirler. Derideki dendritik hücreler; Langerhans hücreleri olarak bilinir. Yaşla birlikte Langerhans hücrelerinin hem sayısı hem de UV ışınlarına karşı verdikleri yanıt azalır. T hücrelerinin sayısı ve sitokin üretme kapasiteleri de azalmaktadır. Langerhans hücre yoğunluğu güneş gören alanlarda UV ışınlarından korunmuş, deri alanlarının yarısı kadardır. Bu durum; yaşın ilerlemesiyle UV ışınlarıyla ilişkili deri hastalıklarının, özellikle de deri kanserinin gelişmesine yol açar (29-31,59,60).

2.2.2.2. Dermis

Deri yaşlandıkça dermis kalınlığı azalır (50,51). 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 ile % 15 oranında tip III kollajen bulunurken yaşla birlikte tip I kollajende azalma görülür. UV ışınlarına maruz kalmış deride de tip I kollajen miktarı 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” azalmıştır. Buna bağlı olarak da foto-hasarlanmış derinin mekanik hasarlara karşı hassas olabileceği düşünülmüştür (33,50,51).

Yaşlanma neticesinde dermiste kollajen liflerinde düzensizleşme ile anormal elastin içeren madde birikimi görülmektedir (46). 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 (46,47). 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 (46,47,50,51).

Yaşla birlikte papiller dermis vaskülaritesinde azalma görülür (50). Dermal damarlanmanın azalması, deride solukluğa ve ısının azalmasına yol açar. Dermal damarlardaki destek dokusunun progresif kaybı yaşla birlikte ekimozların artışına neden olur. 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 oluşur (50,51,61).

2.3. Anti-aging Tedavi Yöntemleri

Son yıllarda, 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 (56). Deri yaşlanmasında farklı faktörlere bağlı olarak farklı klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Optimal sonucu elde etmek için hastalan dermatologlar tarafından dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi, güvenli ve etkili kozmetik girişimin seçilmesi ve uygulanması gerekmektedir (56,62,63).

Yaşlanmayı geciktirmek ve/veya ortaya çıkardığı sorunları gidermek amacıyla bazı farmakolojik ajanları içeren kozmesötik preparatların kullanımının yanı sıra cilt soyma, lazer uygulaması, dolgu maddeleri ve botoks enjeksiyonları ile cerrahi yöntemler kullanılmaktadır (64-71).

2.3.1. Farmakolojik Ajanlar

2.3.1.1. Güneşten koruyucular

Ultraviyole (UV) ışınları ekzojen yaşlanmanın, düzensiz pigmentasyonun ve kırışıklıkların en önemli nedenidir (65). Güneşten koruyucular piyasaya ilk sürüldüklerinde 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. Naylor ve arkadaşları Amerika'da gerçekleştirdikleri aktinik keratoz çalışması süresince düzenli

olarak güneşten koruyucu kullananlarda dermal elastozisde belirgin azalma olduğunu bildirmişlerdir (64). Kısa dönem yapılan bir çalışmada da UVA ışınlarını da içeren geniş spektrumlu güneşten koruyucu kullanmanın güneş hasarının birçok biyokimyasal etkilerini önlediği gösterilmiştir (65). Bununla birlikte, güneşten koruyucuların ince kırışıklıkların oluşumu üzerindeki etkilerini inceleyen iyi planlanmış prospektif bir çalışma bulunmamaktadır (65,66).

Güneşten koruyucular, deriyi güneş ışınlarının oluşturduğu hasardan koruma açısından en etkili yöntem olmakla birlikte, koruma etkileri içerdikleri koruma faktörleri ile paralellik göstermektedir (65,66). Güneşten koruyucular, sahip oldukları faktörün 1/3'ü kadar koruma sağlar ve yeterli etkinliğe ulaşabilmek için en az 2 mg/cm² şeklinde uygulanması gerekmektedir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda sub-eritematojenik dozlarda bile DNA hasarının olabileceği gösterilmiştir. Diğer bir deyişle, güneşten koruyucular yalancı bir korunma hissine neden olmaktadır. Piyasadaki ürünlerin hiçbiri tüm UV ışın spektrumunu kaplayan bir koruma sağlamadığı için, bunların kullanımı daha uzun süre güneşte kalınabileceği anlamına gelmemelidir. Ayrıca, güneşten koruyucuların içindeki maddeler UV ışını ile etkileştiklerinde kendileri de serbest radikal halini alıp, deriden emilerek zararlı etkiler oluşturabilmektedirler (63,65,66).

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 (63,66).

2.3.1.2. Hidrokinon

Hidrokinon içeren ürünler, deri yaşlanmasına ya da foto-yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan pigmentasyon bozukluklarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (63). Renk açıcı etkisi iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Bu da 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 (63,67).

2.3.1.3. Retinoidler

Retinoidler; A vitamininin fonksiyonel ve yapısal analogudur (67). Hücre diferansiasyonunda, proliferasyonunda, immun sistem üzerinde ve embriyonik gelişmede, intrasellüler nükleer reseptörleri etkileyerek çok sayıda farklı etkiler oluşturmaktadırlar (67,72).

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 (67,72,73).

Tretinoin kullanımı ile epidermal atipi normale dönmekte ve üst dermiste yeni kollajen oluşumu izlenmektedir (67). 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 (67,72).

Tretinoinin anti-aging etkisi, dokuda hasara neden olan metalloproteinazlar üzerine inhibitör etki göstererek ortaya çıkar (67). UVB ışını ile temas sonucunda matriks metalloproteinazları (MMP) aktive olarak derideki kollajenin tamamen yıkılmasına neden olurlar (67,72).

Fisher ve arkadaşları tretinoin uygulanmasının MMP'nin inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (74). Kollajenaz gibi enzimlerin artışına ek olarak UV ışınları teması ile kollajen üretimi de azalmaktadır. Derinin all-trans retinoik asit ile UV ışınlarının teması öncesi tedavi edilmesinin prokollajen sentezi kaybını inhibe ettiği gösterilmiştir. UV ışınları teması öncesi derinin topikal retinoidlerle proflaktik olarak tedavi edilmesinin, foto-hasarlanma tedavisindeki kadar etkili olabileceği öne

sürülmüştür. Topikal retinoidlerin ışıktaki stabiliteilerinin bozulması nedeni ile bu ürünler gece kullanılmaktadır. Bilinenin aksine fototoksik özellikleri yoktur. Retinoid kullanımını sırasında; mutlaka kuru cilde uygulanmasına, başlangıçta aralıklı olarak kullanılmasına, beraberinde asit ve C vitamini içeren ürünlerin kullanılmamasına dikkat edilmelidir (75,76).

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 (67,72,76).

2.3.1.4. Antioksidanlar

2.3.1.4.1. E Vitamini (α -tokoferol)

E Vitamini, Stratum corneumun lipid yapılarının ve proteinlerinin oksidasyondan korunmasında önemli rol oynamaktadır (17). E vitamininin lipofilik yapısı deriye uygulanması ve absorpsiyonu için oldukça uygundur. Birçok çalışmada E vitamininin hayvan derisine topikal olarak uygulanması ile fotoprotektif etkisi olduğu da gösterilmiştir (17,67). Topikal α -tokoferol uygulanan tavşan derisini UV ışınlarının oluşturduğu eritemden, fare derisinde ise UV ışınları ile indüklenen lipid peroksidasyondan, foto-yaşlanmadan, UV ışınlarının neden olduğu immunosupresyondan ve fotokarsinogenezisten koruduğu gösterilmiştir (17,67). α tokoferol, fotokarsinogenesi fare derisinde epidermal p53 geninde UV ışınlarının indüklediği sikloprimidine dimer oluşumunu inhibe ederek göstermektedir. Fotoprotektif etkilerine ek olarak, α -tokoferol melanojenesi de inhibe etmektedir. Ayrıca, topikal α -tokoferolun 290 nm dalga boyunda bir miktar fotoprotektif etkisi de vardır. Şimdiye kadar topikal uygulanan E vitamininin net faydalan konusunda yeterli sayıda kontrollü çalışma yapılmamıştır. Topikal uygulanan saf α -tokoferol (oral formu) potansiyel bir sensitizandır, direk olarak deriye bu formda uygulanmamalıdır (17,67).

2.3.1.4.2. C Vitamini (Askorbik asit)

C vitamini yani L-askorbik asit, aktif formda yaşlanmanın etkilerini serbest radikallerle etkileşerek azaltmaktadır (17). 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 akümülyasyonunu azaltmakta, tirozinazı da inhibe ederek pigment sentezini önlemektedir (17,67).

Topikal uygulanan L-askorbik asidin UVB ve UVA ışınlarının oluşturduğu fototoksik hasara karşı koruma sağladığı, farelerde UVB ışınının oluşturduğu immunosupresyona karşı koruma ve kontak allerjenlere karşı tolerans sağladığı gösterilmiştir. Topikal uygulanan L-askorbik asit, insan derisinde prokollajen I ve III için mRNA seviyelerini ve prokollajen sentezinde önemli rol oynayan enzimleri arttırmıştır (10,67).

İnsanlar, vücutlarında askorbik asidi sentezleyemedikleri için mutlaka dışarıdan alınmalıdırlar. Oral alındığında, emilimi kontrol altında olduğu için deriye ulaşan miktar da az olmaktadır. Bu nedenle derideki konsantrasyonu arttırmak için en etkili çözüm topikal olarak uygulanmasıdır (15,41,53).

2.3.1.4.3. Selenyum

Selenyum; memelilerde oksidatif strese karşı savunmada gerekli olan glutatyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimlerinin fonksiyonu için gerekli bir eser elementtir, bu enzimlerin fonksiyonları selenyum desteği ile arttırılabilir (67). Çeşitli çalışmalarda selenyumun sitotoksisite, DNA oksidasyonu, DNA hasarı, IL-10 ekspresyonu, lipid peroksidasyonu gibi UV ışın hasarına karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Oral yolla verilen sodyum selenitin tüysüz farelerde UV ışınlarının neden olduğu eritemi, ardışık pigmentasyonu ve deri kanseri oluşumunu önlediği gösterilmiştir (67). 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 ışını ile indüksiyonunu doz bağımlı olarak inhibe etmektedir. Ayrıca, selenyum hücrel ve humoral immunitiyi de uyarılmaktadır (75). Tüm bunların yanı sıra selenyumun anti-kanserojen etkileri vardır. Selenyum ve diğere antioksidanlar daima dengeli beslenmenin bir parçası olarak alınmalıdır. Aksi takdirde, pro-oksidan gibi davranarak DNA hasarına yol açabilirler (67,75).

2.3.1.4.4. Çinko

Çinko, insanlar için esansiyel bir elementtir (67). Deri ve ekleri, çinkodan zengindir. Toplam vücut çinkosunun %20 sini içermektedir. Çinko, vücutta birçok moleküle bağlanarak aktivitelerini etkilemektedir. Dokularda önemli antioksidan etkileri vardır. Hücre çalışmalarında UV ışınlarının indüklediği sitotoksikite, DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna karşı koruduğu gösterilmiştir. Çinko tuzlarının topikal kullanımında güneş yanığı hücrelerinin oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (67,75).

2.3.1.4.5. Melatonin

Melatonin; serbest radikalleri, reaktif oksijeni ve nitrojen türlerini direkt olarak nötralize etme yeteneğinin yanı sıra, dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon reduktaz gibi çeşitli antioksidan enzimleri de uyarılmaktadır (28). Melatonin membran lipidlerini ve çekirdek DNA'sını oksidatif hasara karşı belirgin ölçüde korumakta ve farelerde cilt kanserini oluşma riskini azaltmaktadır (28,67).

2.3.1.4.6. Yeşil çay

Uzun yıllardır, Asya ülkelerinde yaygın olarak kullanılan yeşil çayın, antioksidan ve anti-kanserojen etkileri vardır (67). Antioksidan etkisi içerdiği polifenollere bağlıdır. Bu polifenollerin oral veya topikal alımının hayvan deneylerinde

anti kanserojen etkisi olduğu, foto-yaşlanmayı da önlendiği ve anti-inflamatuvar yanıtı arttırdığı gösterilmiştir (77). İnsan cildi üzerinde UV ışınlarına karşı koruyucu etkisi kanıtlanmış olsa da bunun uzun dönem etkilerinin araştırılması gerekmektedir (67,77).

2.3.1.4.7. N-Furfuriladenin e (Kineraz)

Kineraz bitkisel bir sitokinindir ve hiperpigmentasyon, kabalaşma, ince çizgiler ve sarkmayı azaltıcı etkisi bulunmaktadır (67). 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 önemli sayıda kapsamlı çalışma mevcut değildir (67).

2.3.2. Cilt Soyma (Peeling)

Tüm ablatif cilt yenileme işlemlerinde deri kontrollü olarak belirli bir derinliğe kadar soyulup yüzeyi daha düzgün olan yeni deri oluşumu indüklenmektedir (12). Bu kontrollü hasarlıma işlemi kimyasal ve mekanik yöntemlerle veya lazer kullanılarak yapılabilir. Soyma işlemi, oluşturulan hasarın derinliğine göre; yüzeysel, orta ve derin olarak sınıflanmaktadır. Yüzeysel uygulamalarda epidermin 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 (12,43,45,63).

Fotoyaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan değişiklikler cilt yenilemenin sık olarak kullanıldığı durumlardır. Fotohasarın belirlenmesi, uygulanacak tedavinin seçimi açısından oldukça kullanışlıdır. Hasarın derinliğine göre farklı yöntemler tek başına ya da kombine olarak kullanılabilir (63).

Kimyasal ve mekanik cilt yenileme endikasyonları (45,63);

- Foto yaşlanma ve ince kırışıklıklar

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

2.3.3. Lazer Uygulamaları

Otuz yıldan fazla süredir karbondioksit lazer (10600 nm) cilt yenilenmesi için kullanılmaktadır (68,70). 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 karbondioksit lazerler kullanılmaya başlanmıştır. Bu sistemler, foto-hasara uğramış deri tabakalarında daha hassas kontrol ile cilt yenilemesi yapmaktadırlar. karbondioksit lazer, fotoyaşlanmada yüzey yenileme (resurfacing foto-aging) için oldukça etkili olmakla beraber post operatif viral ve bakteriyel enfeksiyon, skar oluşumu ve kalıcı hipopigmentasyon gibi riskleri vardır (68,70,71).

2.3.4. Dolgu Maddeleri

Dolgu maddeleri, yaklaşık bir asırdır kırışıklıkları ve skarları düzeltmek, konturu iyileştirmek ve dudakları büyütmek için kullanılmaktadır (56). Kullanılan ajanlar; otolog yağ, kadavradan elde edilen kollajen allograftları, sığır kollajeninden elde edilen kollajen xenograftları, hyaluronik asit ve sentetik materyallerdir. Sığır ve insan kaynaklı kollajenler günümüzde en sık kullanılan dolgu maddeleridir (56,63).

2.3.5. Botoks

Botulinum ekzotoksini (BTX) yüzde estetik görünümü iyileştirmek amacı ile sıklıkla kullanılmaktadırlar (63). Yaşlanma ile ortaya çıkan glabellar çizgiler, horizontal alın çizgileri, kaz ayakları gibi hiperdinamik çizgilerin tedavisinde oldukça başarılıdır. Son yıllarda, yüzün orta ve alt kısmı ile 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 (63,66).

2.4. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres genel olarak prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu patolojik bir tablodur (78). 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 (78).

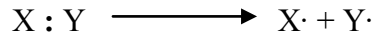
Oksidatif stres ve buna bağlı biyolojik etkilerin birçok hastalıkla ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaktadır (79). Bu hastalıklar arasında kalp damar hastalıkları, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, bazı kanser türleri, nörodejeneratif hastalıklar, katarakt, respiratuvar distres sendromu, romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları bulunmaktadır (79,80). Ancak, serbest radikal ve antioksidan sistemlere ait enzimlerin referans değerleri hakkında literatürde bazı çalışmalar olmasına rağmen halen çok fazla veri bulunmamaktadır (81-83).

2.4.1. 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 (84). Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede bir birine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur (84).

Bir serbest radikal üç yolla ortaya çıkabilir (85):

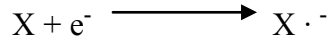
- Kovalent bağ taşıyan bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.



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



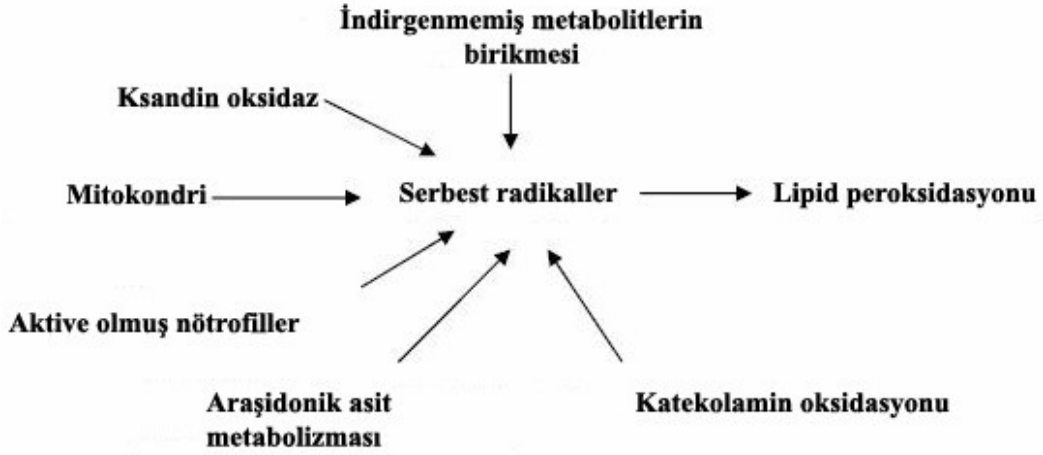
- Bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (84). Serbest oksijen radikalleri yapılarındaki dengesizlik nedeni ile çok aktif olduklarından tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliği gösterirler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (86).

2.4.1.1. 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 2.2) (87,88).



Şekil 2.2. Serbest oksijen radikallerinin kaynakları (87,88)

Oksijen, dünyada en çok bulunan moleküldür (89). 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 (89). Patolojik olarak önemli oksijen türevleri ise, Çizelge 2.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Organizmada serbest radikal oluşma yolları (87-89)

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. Glutasyon 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 (87-89)

Patolojik olarak önemli oksijen radikalleri:	
Adı	Moleküler Formülü
Süperoksit radikali	O ₂ ⁻
Hidroksil radikali	·OH
Nitrik oksit	NO·
Ferril iyonu	FeO ⁺²
Perferril iyonu	FeO ₂ ⁺²
Allil	R·
Aloksil	RO·
Peroksil	ROO·
Radikal olmayan oksijen türevi bileşikler:	
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Singlet Oksijen	¹ O ₂
Ozon	O ₃
Hipoklorit asit	HOCl
Lipit hidroperoksit	LOOH
Peroksinitrit	ONOO·

2.4.1.2. Lipit Peroksidasyonu

Günümüzde serbest radikaller nedeniyle, biyomoleküller, membranlar ve dokularda meydana gelen oksidasyonun pek çok patolojik olayda önemli rol oynadığı kabul edilmektedir (86). 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 (90).

Lipid peroksidasyonu, 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 (91).

2.4.1.2.1. Lipit Peroksidasyonunun Mekanizması

Lipid peroksidasyonunun oluşumu başlama, yayılma ve sonlanma şeklinde 3 aşamada gerçekleşir (91):

Başlama: Redoks katalisti olarak görev yapan Fe^{+++} veya Cu^{++} gibi geçiş metal iyonlarının varlığında, serbest radikallerin hepsi, lipid peroksidasyonunu 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 radikalini oluştururlar (91).

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

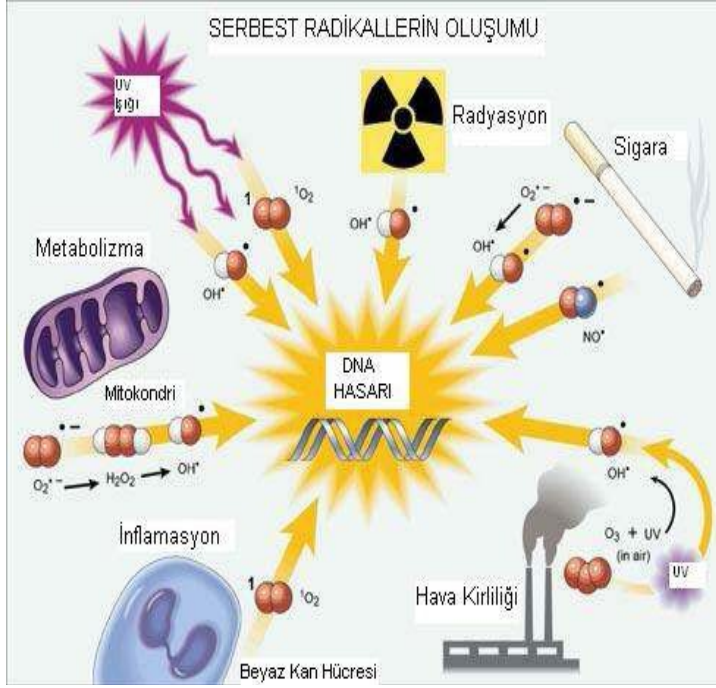
olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri, lipit hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (91).

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 (91).

2.4.1.2.2. Lipit Peroksidasyonunun Sonuçları

Peroksidasyon sırasında oluşan peroksi radikalleri, lipit hidroperoksitler ve bunların yıkım ürünleri, biyomembranlar, subsellüler organeller ve enzimler üzerinde toksik etkilerini gösterirler (87). 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, disülfitlere (S-S) oksitleyerek, bu bileşiklerin aktivite ya da fonksiyonlarının değişmesine neden olurlar (87,91).

Subsellüler organellerin yapısını ve fonksiyonlarını bozarlar (87). Mitokondrilerde oksidatif fosforilasyonu çözerler, mikrozomal enzim aktivitelerini değiştirirler. Hatta, lizozomal hidrolitik enzimler gibi organel içeriklerinin de salınımına yol açarlar (87,91). Serbest radikallerin oluşma yolları ve yapmış olduğu DNA hasarı Şekil 2.3'de şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Serbest radikallerin oluşma yolları ve yapmış olduğu DNA hasarı (91)

2.4.1.3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Hasarının Dokular Üzerine Etkileri

Serbest oksijen radikalleri ile makromoleküller (proteinler, DNA/RNA, lipitler, karbonhidratlar) arasındaki etkileşimler geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz oksidatif hasara yol açabilir (92).

DNA/RNA üzerine olan etki; deoksiriboz halkasının ayrılması, baz hasarı, zincir kırılmaları sonucunda mutasyonlar, translasyonel hatalar ve protein sentezi inhibisyonu şeklindedir (92).

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 (92).

Çoklu doymamış yağ asitlerine etki; lipit peroksidasyon ürünlerinin oluşumu, hücre membran akışkanlığında azalma, permeabilite değişiklikleri ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere yol açar (92).

Karbonhidratlar üzerine olan etki sonucu özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve oksoaldehitler (glioksal vs.) oluşur.

Antimitotik özellik gösteren oksoaldehitler karsinogenez ve yaşlanmada rol oynarlar (92). Serbest radikallerin neden olduğu başlıca hastalıklar Çizelge 2.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4. Serbest radikallerin neden olduğu başlıca hastalıklar (92)

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

2.4.2. Antioksidanlar

Organizmada tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırasında sürekli olarak oksidanlar üretilmektedir (93). Bu reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta, antioksidan savunma sistemleri olarak bilinen bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Böylece, sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge halinde bulunur. 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 (94).

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 (95). 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 (95).

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu yollarla gösterirler (95):

- Serbest radikal oluşumunun önlenmesi veya serbest radikallerin ortamdaki 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 (flavonoidler, 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 (93).

2.4.2.1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

2.4.2.1.1. Süperoksit Dismutaz

Bu enzim, süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (96). Hücresel düzeydeki süperoksidin en önemli düzenleyicisidir. İnsanlarda iki tipi bulunmaktadır (96). Bunlardan biri sitozolde bulunan dimerik, bakır ve çinko içeren izomeri (Cu-Zn SOD), diğeri ise, mitokondride bulunan tetramerik yapıdaki mangan ihtiva eden izomeridir (MnSOD) (97). SOD'ler metalloproteinler olup dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek, yani bir süperoksid molekülünü oksijen molekülüne yükseltgeyip, diğeri süperoksid molekülünü H_2O_2 'ye indirgeyerek çalışmaktadırlar. Dismutasyon olayı normalde pH 4.8'de en hızlı olacak şekilde cereyan

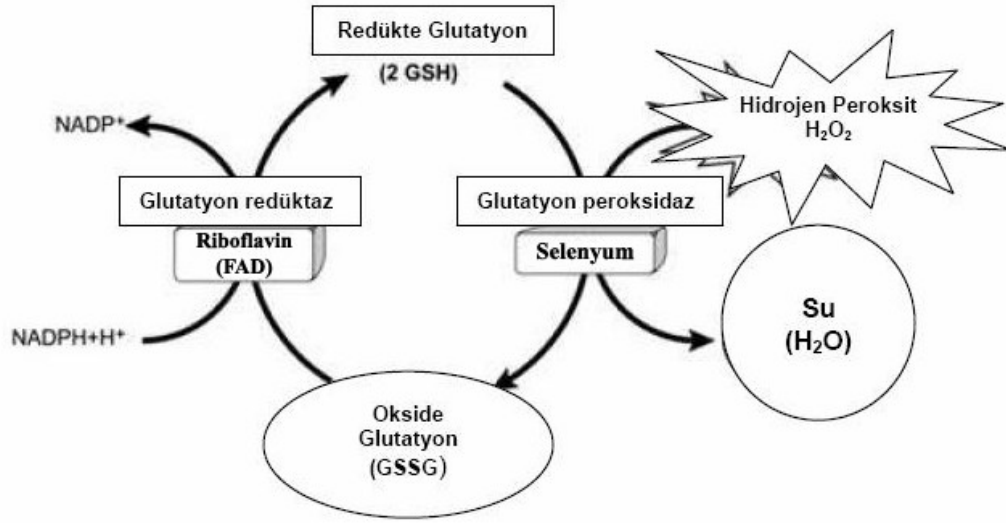
etmektedir. Fizyolojik şartlar altında bu reaksiyon oldukça yavaştır. Fizyolojik pH'da SOD varlığında bu tepkime dört kat daha hızlı çalışmaktadır. SOD tarafından meydana getirilen H_2O_2 'nin katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından metabolize edilmesi nedeniyle SOD, katalaz ve GPx ile birlikte çalışmaktadır. İnsanlarda SOD'nin doğuştan yokluğu tespit edilememiştir. Bunun nedeni, bu tarz mutasyonların fetal oluşlarıdır (98). Romatoid artrit, diabetes mellitus, Behçet hastalığında süperoksid üretimi ile temizleyici sistem arasında negatif bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, Down sendromluların eritrositlerinde Zn SOD'nin yüksek olduğu, prematürelerin ve psöriasis hastalarının lökositlerinde ise düşük olduğu gösterilmiştir (98).

2.4.2.1.2. Glutatyon Peroksidaz

Hiperoksidlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir (98). 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 glutatyon ise yükseltgenmektedir. GPx'in hidrojen peroksid ve hidroperoksidleri indirgemesi glutatyon redüktaz ve NADPH mevcudiyetine bağlıdır (98,99). Glutatyon redüktaz, glutatyonun okside formunun redüksiyonundan sorumludur. GPx aktivitesindeki azalma şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır. Bu durum özellikle selenyum eksikliği halinde karşımıza çıkmaktadır. Çünkü; selenyum, bu enzimin integral bir parçasıdır. E vitamini yetersizliği durumlarında membranları oksidatif strese karşı GPx korumaktadır (100).

2.4.2.1.3. Glutatyon Redüktaz

GPx'in reaksiyonu sırasında oluşan okside glutatyonu (GSSG), redükte glutatyon (GSH) dönüştürerek dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir (101). Bu kataliz gerçekleştirilirken koenzim olarak NADPH kullanılır (101). GR enziminin hücresel fonksiyonu GSH:GSSG oranının 20:1 olarak kalmasını sağlamaktır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Glutasyon döngüsü (101)

Normal şartlarda, GR ile GSSG'nin redüksiyonu oldukça hızlıdır. Ancak, oksidatif stres söz konusu olduğunda, GSSG birikimi olabilir. Bu durumda GSSG, ya hücrelerden taşınır ya da protein sülfhidrilleri ile etkileşerek protein-disülfidlenmiş glutasyon ürünleri oluşumuna yol açar (102).

2.4.2.1.4. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Glutasyon-S-transferazlar, hücresel detoksifikasyon ve transporttan sorumlu iki protein alt birimden oluşan multifonksiyonel protein ailesidir (103). Genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılır. GST ailesi hepatositlerdeki başlıca detoksifiye edici sistemdir (103). Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksitlere karşı GST'ler, selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler (103).



GST'ler, glutasyonun reaktif metabolitlerle konjugasyonunu sağlayarak organizmadan uzaklaşmasını sağlamaktadır (104).

2.4.2.1.5. Katalaz

Bir hemoproteindir (97). 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 (97).

2.4.2.2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

2.4.2.2.1. Antioksidan Vitaminler

Vitaminlerin yeterli miktarda alınmaları normal büyüme gelişme ve sağlığın sürdürülebilmesi için gereklidir. Günümüzde vitaminlerin nutrisyonel durumu kandaki konsantrasyonlarının ölçümü ile ortaya çıkmaktadır (105).

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 (106).

Vitamin eksikliği yaygın olmamasına karşın doğumsal metabolizma bozukluklarında veya diyet ile alımının ciddi şekilde kısıtlanması sonucunda eksiklik görülebilir (107). 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 (107).

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 (107).

Günümüzde laboratuvarlarda plazma, tam kan veya eritrositlerde vitaminlerin konsantrasyonlarını, vitamin durumunu kesin olarak değerlendirecek objektif metodlar ve veriler halen bulunmamaktadır (105). Kullanılan RDA değerlerinin ölçüm metodlarından bağımsız referans değerler olmadıkça kesin olamayacağı bildirilmiştir (106).

C vitamini, diyetle alınması zorunlu bir vitamindir. Biyolojik sıvılarda çözünen C vitamininin antioksidan etkileri (108);

- Güçlü bir elektron donörüdür ve redükleyici ajandır. Serbest radikallere karşı süpürücü görevi yapar
- O_2^- radikalini, OH radikalini 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 (109).

E Vitamini; yağda çözünen esansiyel bir vitamindir (110). E vitamininin, insan dokusunda en fazla bulunan ve en yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan alfa tokoferol formu antioksidan aktivitesi de en yüksek olan formudur (110,111). Alfa tokoferolün yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka antioksidan aktiviteden sorumludur (112). Alfa tokoferolün antioksidan fonksiyonları (111-113);

- Alfa tokoferol oluşan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerine karşı çok güçlü bir süpürücüdür (111).
- E vitamini, peroksidler üzerindeki nötralize edici etkisini kendisinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline transfer etmek suretiyle yapar (111,112).
- 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 (113).

A vitamini siklohekzenil halkası taşıyan bir poliizopren bileşiğidir (107). Doğadaki en potent ve en iyi bilinen provitamin A, β -karotendir (114). 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 (115). Her β -karoten molekülü iki peroksil radikalini bağlayarak ortamdan uzaklaştırır. Ortamdaki oksijen konsantrasyonunun yüksek olması halinde ise reaktif bir peroksil radikali oluşur (115).

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, B_6 vitamini direkt etki gösterir (116,117).

2.4.2.2.2. Albümin

Albümin proteinik yapıdadır. Kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar (94). 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 (94,95).

2.4.2.2.3. Bilirubin

Hem katabolizması ile meydana gelen ve albumine bağlı olarak taşınan bir safra pigmentidir (94). Yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruma görevine sahiptir (94,95).

2.4.2.2.4. Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipit peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır (94,95).

2.4.2.2.5. 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 (94,95).

2.4.2.2.6. Ürik Asit

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği, antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipit peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir (94,95).

2.5. Hücre Kültürü

Bir doku veya organdan hücrelerin izole edilerek in vitro ortamda çoğaltılarak üretilmesi ve bu üretilen hücrelerin devamlılığının sağlanması “hücre kültürü” olarak adlandırılır (118). Hücreler, şişe yüzeyine yapıştırılan doku parçasından spontan migrasyon ile şişe yüzeyine yayılarak üretilebileceği gibi, dokudan mekanik ya da enzimatik yollarla ayrıştırılarak da üretilebilir. Hücreler, hücre kültüründe doku organizasyonu göstermezler. Hücreler doku organizasyonunu göstermediğinden dolayı da özellikle histiotipik yapılarını ve çoğunlukla bu yapılarla ilişkili olarak biyokimyasal özelliklerini de kaybederler. Genellikle, hücreler hücre kültüründe özel şartların sağlanması koşuluyla çoğalmadan canlılıklarını koruyabilirler. Aynı zamanda bunun tam tersine hücreler istenilen miktarlarda çoğaltılarak da elde edilebilirler. Hücreler seçici besiyerinde üretilerek, fiziksel hücre seperasyonu yapılarak veya klonlama ile fenotipik ya da genotipik olarak ayrılarak karakterize edilebilir. Bunun sonucunda da belirlenmiş bir hücre popülasyonu dondurularak uzun yıllar saklanabilir (118).

2.5.1. Primer Hücre Kültürü

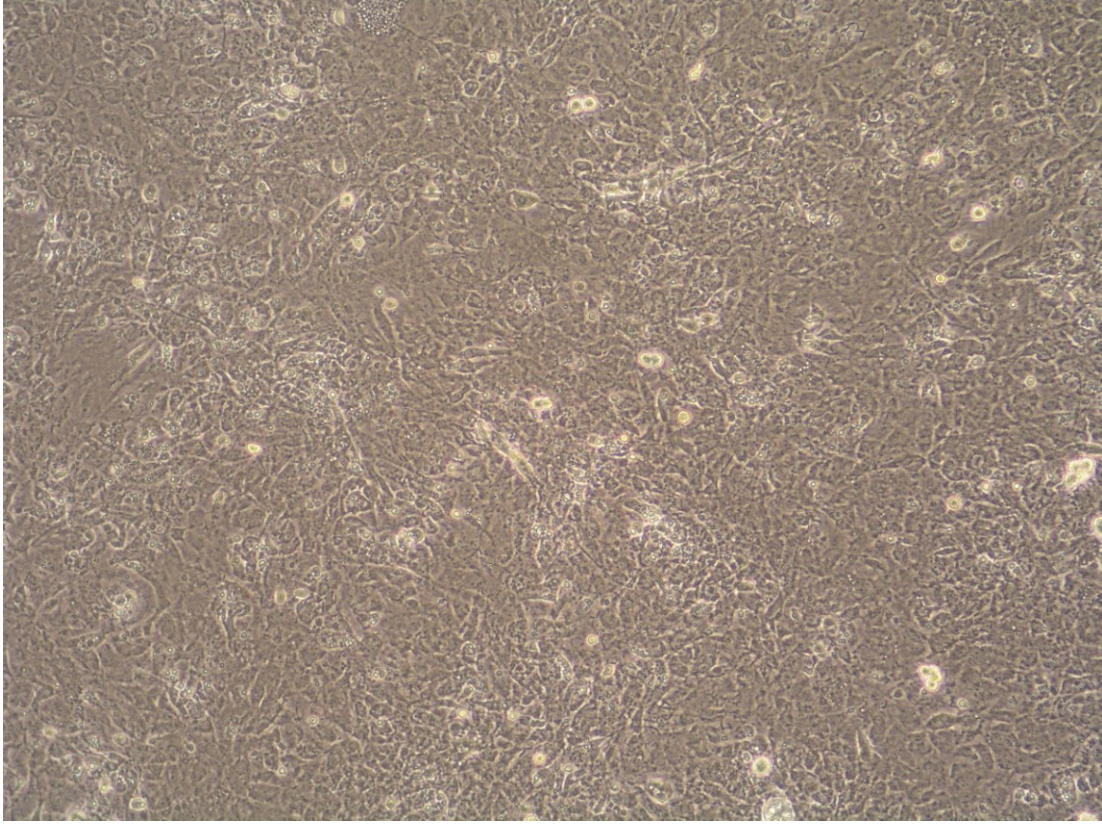
Primer hücre kültürü; organizmadaki yeni alınan organ ve dokulardan ilk üretilen hücre kültürüdür (118). Primer eksplant tekniği, mekanik yöntemler ya da enzimatik yöntemler kullanılarak organ veya dokulardan primer hücre kültürü hazırlanabilir. İçerisinde besiyeri bulunan kültür şişelerine inoküle edilen canlı hücreler, şişe yüzeyine yapışarak çoğalmaya başlar. Birbirine değen hücrelerde kontakt inhibisyon nedeniyle çoğalma durur ve bunun sonucunda tek tabakalı hücre kültürü gelişir. Transforme olmayan hücrelerin hücre kültürleri için düz bir zemine yapışması söz konusudur. Bu nedenle; hem primer, hem de diploid hücrelerin süspansiyon kültürleri yapılamamıştır (118,119).

Metabolik aktivitenin düşük olduğu primer kültürlerinin besiyerlerinde buna paralel olarak asit birikimi de yavaştır (119). Primer hücre kültürlerinde primer hücreler en fazla 8-10 pasaja kadar kültür devam ettirilebilir. Primer hücre kültürlerindeki bu primer hücreler genellikle, orijinal hücrelere özgü karakteristik diploid kromozomuna sahiptir. Primer hücre kültürü genellikle epitelyal, fibroblast ya da epitelyal ve fibroblast

hücrelerinin bir arada bulunduğu heterojen yapı gösterir. Primer hücre kültür teknikleri özellikle ekovirüsler veya ortomiksovirüslerin izolasyonu için faydalı olsa da, bu tekniklerin bazı dezavantajları vardır. Bu dezavantajlardan biri; primer hücre kültürleri taze doku örneklerinden hazırlanmalıdır. Bir diğer dezavantaj özel ihtimam gerektiren primer hücre kültürlerinin hazırlanmasının zor oluşudur. Ayrıca; konak hücrede endojen virüslerin latent halde bulunması ya da kültürde meydana gelen kontaminasyon hücrenin üremesi ve virüs izolasyonu açısından zorluklar oluşturabilir (118,119).

2.5.2. Diploid Hücre Kültürü

Primer hücre kültürünün subkültürü sonucunda meydana gelen hücre kültürleri; histolojik olarak tek tip hücreden oluşan ve az sayıda pasajı yapılabilen sonlu hücre kültürleri ve sınırsız bölünme kapasitesine sahip devamlı hücre kültürleri olmak üzere iki şekilde sınıflandırılır (118). Sonlu hücre kültürleri, az sayıda pasajının yapılabilmesinden dolayı sınırlı sayıda subkültürden sonra üreme yeteneklerini kaybederler. Sınırsız bölünme kapasitesine sahip devamlı hücre kültürlerinin ise, sonsuz sayıda subkültürleri yapılabilir. Az sayıda pasajı yapılan ve sınırlı sayıda subkültürden sonra üreme yeteneklerini kaybeden sonlu hücre kültürleri “diploid hücre kültürü” olarak da adlandırılır. Genellikle, diploid hücre kültürleri, iğ şeklindeki fibroblastoid hücrelerden oluşur (119). Memeli embriyonik dokularından ya da yeni doğanın sünnet derisinden elde edilen fibroblastoid hücre kültürlerinden 50-100 pasaj yapılabilir (118-120). Embriyonal fare fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü Şekil 2.5’de gösterilmiştir (120).



Şekil 2.5. Fare embiyonik fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüsü (120).

Diploid hücre kültürlerinin ilk pasajlarına ait hücre kültürleri sıvı nitrojende saklanabilir. Bu hücreler, 8-10 pasaja kadar viral duyarlılıkta değişme meydana gelmeden kullanılabilir (119). Diploid hücre kültüründeki bu hücrelerin en az %75'i primer hücrelerde olduğu gibi orijinal olarak elde edilen normal hücre türü ile aynı karyotipe sahiptir. Bazı virüsler için diploid hücre kültürleri primer kültürler kadar duyarlı değildir. Bunun yanı sıra, çok sayıda pasaj yapılmış kültürlerde virüs replikasyonu yeterli olmayabilir. MRC-5 ve WI-38 insan akciğer fibroblast kültürleri diploid hücre kültürlerine örnek olarak verilebilir (118,119).

2.5.3. Devamlı Hücre Kültürleri

Devamlı hücre kültürleri, sonsuz üreme özelliğine sahip ölümsüz hücrelerden oluşur (118). İn vitro olarak tümörlerden alınan hücrelerden ya da hücrelerin spontan veya kimyasal ajanlarla transformasyonunun sonucunda devamlı hücre kültürleri elde

edilir. Normal bir hücre kültürünün devamlı hücre kültürü olabilmesi için 50 ya da daha fazla subkültürünün yapılmış olması gerekir (121). Devamlı hücre kültüründe genellikle hücreler in vitro da uzun süreli yaşamları boyunca geçirdikleri mutasyonlar sonucunda morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından orijinal hücrelerden farklılık gösterirler. Devamlı hücrelerde poligonal veya bal peteği formunda epitelyal hücre morfolojisi görülür. Bunlar, genellikle, kromozom sayıları bakımından aneuploidlerdir (118,121).

Primer veya diploid hücre kültürü ile kıyaslama yapıldığında, devamlı hücre kültüründe bir cam veya plastik yüzeyde kültürün başlatılması için gerekli olan hücre sayısı daha azken, hücrelerin üreme hızları daha fazladır ve kontakt inhibisyon kaybolmuştur (181,121). Bütün bunların sonucunda devamlı hücre kültüründeki hücreler aşırı üremeye eğilim gösterirler. Tanı amaçlı laboratuvarlarda devamlı hücre kültürleri HeLa (insan servikal epitelyal karsinoma), Hep-2 (insan larinks epitelyal karsinoma), BHK 21 (bebek hamster böbreği; Baby Hamster Kidney), MDCK (köpek böbreği; Canin Kidney), RK 13 (tavşan böbreği; Rabbit Kidney), Vero (Afrika yeşil maymun böbreği) ve RD (insan rbdomiyosarkom) için çok sık kullanılır. HSV, adenovirüs, poliovirüs, coxsackievirüs gibi virüslerin üretilmesi için HeLa ve Hep-2 devamlı hücre kültürleri kullanılır (118,119,121,122).

2.5.4. Hücre Kültürlerinin Yapılması

2.5.4.1. Kültürdeki Hücrelerin Gelişme Fazları

İn vitro kültürü yapılan hücrenin morfolojisi in vivo ortamdakine göre oldukça farklıdır. İn vitro olarak çoğaltılmak istenen hücre bu esnada 4 fazdan geçer (123,124).

2.5.4.1.1. Ayrılma Fazı (Dispersiyon)

Direkt olarak insan, hayvan veya kültürden alınan hücreler, normal şekilleri nasıl olursa olsun süspansiyon halinde iken tek tek ya da çok sayıda biraraya toplamış

kümeler halinde ve ışığı fazla kıran yüzeyler şeklinde görünürler (123). Bu hücreler sıvı içerisinde tek tek ya da kümeler halinde serbest durumdadır. Hücreler protoplazmalarının kontraksiyonu sonucu orijinal şekillerinden farklı olarak yuvarlak hale gelirler. Bu aşama dispersiyon veya ayrılma fazı olarak adlandırılır (123,124).

2.5.4.1.2. Yapışma Fazı

Süspande halde serbest olan yuvarlak hücreler bir katı yüzey ile temas ettiklerinde bu katı yüzeye yapışırlar (123). Hücreler bu yapışma sonucunda yapılarına göre poligonal veya fusiform şekline dönüşürler. Hücrenin yüzeye yapışma anında hücrede herhangi bir çoğalma meydana gelmez. Fakat, oldukça yüksek metabolik aktivite gösteren hücre mitoz için hazırlanmaya başlar. Süspande halde olan hücreler, katı yüzeye 37 °C’de 2 saat içerisinde yapışırlar. 24 saat içerisinde hücreler artık yüzeye tamamen yapışmış ve yapısal şekillerini oluşturmuşlardır. Embriyonal dokulardan hazırlanan hücreler 24 saat içerisinde yüzeye yapışarak karakteristik şekillerini gösterirlerken, yetişkin insan kökenli hücreler bu aşamayı daha uzun sürede tamamlarlar. Örneğin; maymun böbrek hücresi ve epitel hücresinin yüzeye yapışma süresi kısa iken, dana ve tavşan böbrek hücresinde ise, bu süre, biraz daha uzundur (123,124).

2.5.4.1.3. Çoğalma Fazı

Hücreler, katı bir yüzeye yapıştıktan birkaç saat sonra çoğalma fazına girerler (123). Çoğalma fazında istisnai durumlar dışında her hücreden iki hücre meydana gelir. Kromozom formasyonu olmadan nukleusun ve bunun hemen ardından sitoplazmanın ikiye bölünmesi “amitoz çoğalma” olarak adlandırılır. Bu tip çoğalma, genellikle, az olmakla beraber in vitro çoğalan hücrelerde oldukça sık görülür (123,124).

Mitoz çoğalma, en sık görülen replikasyon şeklidir (122). Kromozomlar bölünme olmadan önce ikiye ayrılır ve yavru hücreler diploid sayıda kromozom taşırlar. Normal hücrelerde bulunan iki çift kromozom diploid, eğer üç çift ise triploid, dört çiftse tetraploid, dört çiftten daha fazla ise heteroploid olarak isimlendirilir. Bazen hücrelerde bipolar bölünmeler yerine kanser hücrelerinde olduğu gibi multipolar

bölünmeler meydana gelebilir. Hücreler bazen de normal diploid kromozom sayısı yerine, anomali olarak nitelendirilen aneuploid şeklinde çoğalır (122-124).

Örneğin; HeLa hücrelerinde tesadüfi kromozom sayıları aneuploidi olarak nitelendirilir (123). Aneuploid predominanttır ve bu tip hücrelerin nesilden nesile meydana gelme olasılığı kültürü yapılan hücrelerde yüksektir. Burada, stabilite, büyük bir olasılıkla genetik faktör tarafından etkilenmiştir. Normal yetişkin dokularından alınıp üretilen hücrelere göre tümörlü dokulardan alınıp üretilen hücreler daha az stabildir. Ama yinede bu kesin bir kural değildir (123,124).

2.5.4.1.4. Dejenerasyon Fazı

İn vitro kültürü yapılan ve çoğaltılan hücreler, besiyeri içerisinde ki gerekli maddelerin kullanılması sonucunda azalması ya da ortamda aşırı toksik katobolitlerin birikmesi sonucunda bir süre sonra dejenere olurlar (123,124).

2.5.5. Hücre Kültürünün Hazırlanması

2.5.5.1. Eksplant Metodu

Eksplant metodu ile primer hücre kültürü hazırlanırken önce dokular küçük küçük parçalara ayrılır ve kültür şişesine yerleştirilir. Bu metot, Harrison tarafından ilk kez 1907 yılında tanıtılmıştır. Harrison, burada normal kurbağa embriyosunun sinir dokularını kullanmıştır (125).

1951 yılında Gey ve arkadaşları insan servikal kanserinde hücre kültürü başlatmış ve HeLa dizisini üretmişlerdir (126). Küçük doku örnekleri için özellikle eksplant metodu uygundur. Dışa göç eden ilk hücreler fibroblast hücreler olup ondan sonra epitelial hücreler gelmektedir. Dışarıya alınan doku parçasının kenarında oluşacak hücre proliferasyonunu uyarmak bu metodun temel amacıdır. Bu metodu fibroblast benzeri hücre kültürleri ve ayrıştırılmayan dokulardan hazırlanacak hücre kültürleri için kullanmak oldukça elverişlidir. Eksplant metodu ile genç donörlerden

alınarak yapılan primer hücre kültürlerinde başarı oranı oldukça yüksektir. İlk 24 saat içerisinde pek çok eksplant kültüründe hücreler çoğaldığı halde, bazı kültürlerde 10 güne kadar hiçbir değişiklik gözlenmeyebilir (122,125,126).

Eksplant kültürü yapılırken özellikle; doku parçalarını boyutsal olarak büyüklüğü ile birlikte hazırlanış aşamalarına, çoğaldıkları yüzeye yapışmalarına ve uygun kültür besiyerinin seçimine dikkat edilmelidir (122). Doku parçalarını büyüklüğü 1-3 mm³ arasında olmalıdır. Çünkü; küçük doku parçalarının sahip olduğu hücre sayısı azdır. Buna karşılık, büyük doku parçalarında ise, hem besiyerindeki besleyici maddelerin dokuya difüzyonunda meydana gelebilecek zorluklar, hem de toksik metabolitlerin dokudan atılması sırasında doğabilecek sorunlar sebebiyle nekrotik alanlar gelişebilir. Bütün bu nedenlerden dolayı, küçük ya da büyük doku parçalarıyla başarılı sonuçlar elde edilemez. Dokuların kesilmesi sırasında dokunun ezilmemesine ve yırtılmamasına dikkat edilmelidir. Düzgün kenarlı kesilmiş dokular elde edebilmek için küçük, keskin makas vb. aletlerin kullanılması gerekir. Burada organ kültürleri için her zaman muntazam kenarlı dokuların çıkartılması önemli olacaktır diye bir şey söz konusu değildir. Çünkü; hücre çoğalmasını muntazam olmayan kenarlar uyarırlar. Bu nedenle de hazırlama safhasında kesinlikle ezilme ve oluşabilecek zedelenmelerden kaçınılmalıdır. Bunun nedenikü bu ezilme ve zedelenmelerin hücre gelişimini ve canlılığını engellemesidir (127,128).

Dokuların bir plazma pıhtısı üzerine yerleştirilebilmesi ile sıkıca yüzeye bağlanması sağlanabilir (127). Bazı metotlarda ise dokunun kapiller hareketle yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla kullanılan besiyerinin hacmi kısıtlanır. Kültürlerin başarılı sonuçlar verebilmesi için besiyerlerine serum eklenmesi gerekir. %10 veya %20 fetal serumlu besiyerleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Eksplant metoduna nazaran primer kültürlerin yapımında tek veya küçük hücre grupları elde edildiğinde genellikle daha hızlı hücre çoğalması elde edilir. Fiziksel veya enzimatik metotlar dokulardan tek tek veya grup olarak hücreler elde edebilmek için kullanılır. Kullanılacak hücrenin özelliğine bağlı olarak uygulanacak yöntem seçilir (127,129).

2.5.5.2. Fiziksel Ayırıştırma

Fiziksel yöntemlerin kullanımı, hücrelerin birbirine veya stromaya gevşek bağlandığı dokular için oldukça uygundur (127). Fiziksel ayırıştırma 1958 yılında Lasforges ve Ozzelo'nun, 1975 yılında ise, Lasforges'un kullandıkları meme kanser dokularında hücre ayırıştırması örnek olarak gösterilebilir (127,128). Fiziksel ayırıştırma yöntemine göre, önce kültür besiyerinde donör dokusu parçalara ayrılır. Daha sonra, dökülen hücreler sedimentasyon yöntemiyle filtre edilerek toplanır. Lechner tarafından insan neonatal prostatik epitelinden tek sıralı hücre kültürlerinin elde edilmesi için benzer bir yöntem kullanılmıştır (127). Bazı organlarda primer kültürler için gerekli sayıda hücrenin elde edilmesi perfüzyon yöntemi ile sağlanır. Bu yöntemle primer hepatosit kültürleri ve sıçanların pankreas adacıklarının hücre kültürleri hazırlanmaktadır (127,128).

Perfüzyonla ayırıştırma verilen bu iki örnek buna paralel olarak fizyolojik tuzlu su ile perfüzyon aşamasında ya da bunu takiben enzimatik ayırıştırma aşamasını da kapsar (127). Kısa süreli kültür gerektiren durumlarda ve karyolojik çalışmalarda sedimentasyon için bırakılan ve kısa zamanda lökosit açısından zengin çöküntüler ile sonuçlanan venöz kan rutin olarak kullanılır. Burada bahsedilen örneklerden de anlaşılacağı gibi fiziksel hücre ayırıştırma yöntemleri bir veya birden fazla aşamadan oluşur. Doku kesilir ya da parçalar ayrılır, perfüze edilir veya mekanik olarak parçalanır. Hücreler filtrasyon, sedimentasyon ya da santrifüj ile toplanır (127,128).

2.5.5.3. Enzimatik Ayırıştırma

Donör dokusundan hücreleri ayırıştırma için kullanılan yöntemlerin temel prensibi hücrelere zarar vermemesidir (123). Enzimatik ya da diğer kimyasal metotlar çok değişik türdeki donör dokularından hücrelerin ayırıştırılabilmesi için kullanılır. Özellikle enzimatik aktivite ayırıştırma tekniğinin önemli bir parçasıdır. Ayırıştırma işleminin ilk basamağı donör dokusunun 1-3 mm³'lük parçalara ayrılması ile başlar. Bu işlem uygulanırken hem enzimatik aktivasyonun etkileyebileceği maksimum yüzey alanı elde edilebilmeli, hem de mümkün olduğunca hücreler zarar görmeden dokunun

parçalanması sağlanır. Parçalanmış dokular kan ve hücre kalıntılarının temizlenmesi için dengeli tuz solüsyonları ile yıkanır ve uygun konsantrasyondaki enzim solüsyonuna aktararak karıştırılır. Her sistem için enzim konsantrasyonu ve karıştırma hızı deneysel yollarla belirlenmelidir (123,130).

Enzimlerin hücrelere verdiği zararın azaltılmasını sağlamak amacıyla tek bir enzim periyodu yerine kısa ve fazla sayıda enzimle karıştırma periyodu tercih edilmelidir. Bu aşamadan sonra primer kültürü başlatmak için toplanan hücreler uygun hücre üretme besiyeri ilavesi ile inkübasyona bırakılır (123,130).

Tripsin, kollagenaz, hiyaluronidaz, DNaz, pronaz, dispaz ya da bu enzimlerin değişik kombinasyonları primer hücre kültürünün hazırlanmasında en sık kullanılan enzimlerdir. Dokuların ayrıştırılması için çok saf olmayan enzim preparatları tercih edilir. Memeli pankreasından elde edilen bir preparat olan tripsin içerisinde tripsin ve tripsinojenin yanı sıra önemli miktarlarda kemotripsin, kemotripsinojen, elastaz, amilaz, DNaz ve RNaz bulunur (123,130).

Hücreler en iyi şekilde tripsin ve pronaz ile ayrıştırılabilir (123). Ancak bu enzimler hücrelere zarar verebilir. Clostridium histolyticum'un kollajenaz preparatı belirli tip dokuların ayrıştırılmasında yaygın olarak kullanılır. Hücreler için daha az zararlı olan kollejenaz ve dispaz tam olmayan bir ayrışma sağlar. Hiyaluronidaz ve kollajenaz hücreler arası bağ dokusunu sindirmek amacıyla birlikte kullanılır. Kollejenazın çalışması için Ca^{+2} iyonu gereklidir. Bu nedenle Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonları ya tek başına ya da etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'e bağlı olarak ortama eklenir. Doku ayrışmasında çalışılacak hücrelerin birbirlerine veya donör dokusuna nasıl bağlandıklarının bilinmesi kullanılacak uygun enzimin seçilebilmesi açısından önemlidir. En uygun ayrıştırma koşullarını belirlemek için mümkün olduğu kadar çok kontrollü deneylerin yapılması gerekir (123,130).

2.5.6. Kültürleri Yapılan Hücrelerin Üretilmesi

Hücre kültürleri, genellikle, embriyonik dokulardan hazırlanır (118). Çünkü, erişkin dokuya göre embriyonik doku daha uzun süre yaşatılır ve çoğaltılır. Bunun nedeni de büyük bir olasılıkla prekürsör ya da kök hücrelerinin varlığına,

diferensiyasyonun ise daha düşük düzeyde olmasına bağlıdır. Embriyonik hücre dizileri MRC-5 ve bir diğer insan embriyonik akciğer fibroblast en yaygın kullanılan hücre kültürleridir. Epitelyuma (nöronlar ve endokrin doku) göre mezodermal hücrelerin (fibroblast, endotelyum ve miyoblast) kültürünü yapmak daha kolaydır (118-120).

Çoğalmayan diferensiye hücrelerinin yüksek oranda olması, genellikle erişkin dokularının daha düşük üreme oranına sahip olması ile sonuçlanır. Erişkin dokular daha organize yapı gösterir ve bunun sonucunda zor ayrışır. Başlangıç aşamasında kültürün gelişmesi ve çoğalması daha uzun zaman alırken, kültürün hayat süresi daha kısadır. Ayrıca erişkin dokularında endojen virüslerin olma ihtimalinin yüksek olması bu dokulardan yapılacak hücre kültürleri için bir dezavantaj sağlar (118-120).

Hücrelerin içersinde ya da üzerinde üretildiği ortamlar; tek tabakalı hücre kültürünün üretildiği plastik veya cam şişe şeklinde katı bir yüzey olabileceği gibi, yarı katı veya süspansiyon hücre kültürünün üretildiği kollajen veya agar jel içerisinde sıvı bir ortamda olabilir (118). Hücrelerin çoğu, proliferasyon için bir yüzey üzerinde yayılır. Hücrelerin yüzeyde fazla üremesi, yüzeyde yetersiz yayılması ya da yüzeye zayıf yapışmasına bağlı olarak hücre proliferasyonu inhibe olur. Hücrelerin üremesi için gerek duydukları yüzey yapışmasına “tutunma bağımlılığı” (anchorage dependent) denir. Transformasyona uğrayan hücreler çoğunlukla yüzeyden ayrılıp buldukları ortamda serbest hale geçerler. Bu hücreler; süspansiyon halindeki besiyerinde, agar gibi yarıkatı olan bir besiyerinde ya da süspansiyon ve agar gibi yarıkatı besiyerlerinin birlikte kullanıldığı sistemlerde üretilirler (118-120).

Kültürü yapılan hücreler içerisinde buldukları kap ya da şişe gibi katı bir yüzeye yapışarak veya besiyeri içersinde hücre süspansiyonu olacak şekilde iki türlü üretilebilir. Bunlardan yüzeye yapışarak üreyen hücrelerin kültürüne “stasyoner kültürler”, süspansiyon halinde üreyen hücrelerin kültürüne de “süspansiyon kültürler” denir (118-120).

Stasyoner kültürlere tek tabakalı hücre kültürü anlamına gelen “monolayer hücre kültürü” de denir (120). Uygun bir yüzeye yapışmış ve bu yüzeyde çoğalmış olan tüm hücre kültürleri için bu terim kullanılır. Stasyoner kültürler sabit kültür ve döner kültür olmak üzere iki şekilde yapılır. Şişe ya da tüpün sadece bir yüzeyinde üretilen hücre kültürü stasyoner kültürdür. Döner kültürler ise kendi ekseni etrafında dönen silindirik şeklindeki şişe ya da tüplerde hazırlanır. Bu teknik ile şişe ya da tüpün bütün yüzeyinde

hücre kültürü gelişmektedir. Genellikle fazla miktarda hücrenin gerekli olduğu durumlarda döner kültürler kullanılır (118-120).

Transforme olmayan normal hücreler bir yüzeye yapışarak çoğalırlar ve süspansiyon şeklinde üremezler (118). Bu hücrelerin üremeleri hücre yoğunluğunu artırarak tek tabaka haline gelmeleri halinde durur. Transforme olmayan normal hücreler kontakt inhibisyon denen fenomene karşı hassastır. Buna karşılık transforme hücrelerin kontakt inhibisyon fenomeni yoktur ve bu hücreler daha farklı bir çoğalma yolu izlerler. Bu transforme hücreler tek tabakalı durumdan çok tabakalı (multilayer) duruma geçerler ve teorik olarak devamlı çoğalabilirler. Transforme hücreleri süspansiyon kültürler halinde fazla miktarlarda üretmek mümkündür (118-120).

Süspansiyon kültürleri tripsinizasyona ihtiyaç duymadan hücrelerin devamlı yenilenebilmelerini ve ekonomik olarak çok miktarda hücre ve virüs üretimini sağlar (118). Primer kültürler hücrelerin direk organizmadan alınan taze organ ve dokulardan izole edilerek üretilmesi ile elde edilir. Subkültür veya pasaj ise hücrelerin bir kaptan diğer bir kaba aktarılarak üretilmeleri anlamına gelir. Primer hücreler orjin aldıkları hücrenin karyotipini en çok 9-10 subkültüre kadar korurlar. Oysa ki devamlı hücre kültürü sürekli pasajlanarak sürdürülebilir ve bu nedenle de virüs izolasyonu ve identifikasyonu için viroloji laboratuvarlarında en sık kullanılan hücre dizileridir (118-120,122).

2.5.7. Kültürde Hücrelerin Gelişimini Etkileyen Faktörler

Kültür ortamında ki hücrelerin gelişimi birçok temel faktöre bağlıdır (118-120).

2.5.7.1. Sıcaklık

Hücre kültürü için optimal sıcaklığın sağlanmasında hücrelerin izole edildiği kaynağın sıcaklığı göz önünde bulundurulmalıdır. Hücreler 45 °C sıcaklıkta birkaç saat içerisinde ölürlerken, 42 °C sıcaklıkta 12-24 saat yaşayabilirler. İnsan deri hücrelerinden

hazırlanan kültürler ise 37 °C'den daha az bir sıcaklığa ihtiyaç duyarlar. Bunun yanında balık hücrelerinden hazırlanan kültürler 20 °C sıcaklıkta ürerler (118-120,131).

Birçok hücrenin çoğalabilmesi için gerekli olan sıcaklık 36,5-38 °C'dir. Hücrelerin 20-25 °C sıcaklıklarda üremeleri yavaşlar. +4 °C ise hücreler bölünmeleri gecikmiş ama yapıları zarar görmemiş olarak muhafaza edilebilir. Eğer hücreler donma noktasına kadar soğutulursa oluşan buz kristallerinden dolayı parçalanır. Düşük ısılarda oluşan bu buz kristallerini önlemek için besiyerine gliserol veya dimetil sülfoksit (DMSO) gibi koruyucu maddeler ilave edilir ve hücreler kademeli olarak dondurularak -70 °C 'de ya da daha düşük sıcaklıklarda aylarca saklanabilir (118-120,131).

2.5.7.2. Osmatik Basınç

Memeli hücrelerinde osmotik basınç 7.6 atm (300 mosm)' dir. Bu değer 300 mosm+%10 olduğunda hücrelerde herhangi bir hasar meydana gelmez. Osmatik şoklara süspanسیون kültürler daha dayanıksızdır. Besiyerlerinin osmololitesinin ölçümü için osmometre kullanılır (118-120,131).

2.5.7.3. Hidrojen İyonu Konsantrasyonu (pH)

Kültüre edilen hücrelerin üremesi; kültür pH'sının tampon ilavesi ile yaklaşık olarak 7.00 dolaylarında tutulmasına, besiyerinin değiştirilmesine ya da her iki etkene de bağlıdır. Bu iki etken göz önünde bulundurulmazsa hücreler birbirinden ayrılır ya da ölür. Sonuçta hücreler metabolik bir dejenarasyona uğrarlar. Memeli hücreleri pH: 6.8-7.6 arasında yaşayabilmelerine rağmen optimum pH: 7.1-7.5 arasındadır. Kültürlerin pH'sı HEPES (N-2-hidroksi etilpiperazin N-2 etansülfonik asit) ve sodyum hidroksit ilavesi ile ya da bikarbonat tamponunun CO₂ ile desteklenmesi ile ayarlanır. Kültür besiyerlerinin çoğunda pH'nın devamlı sabit kalabilmesi için bikarbonat tampon sistemleri (CO₂/HCO₃) kullanılır. Bu besiyerlerinde NaHCO₃ ve CO₂ bulunur. Besiyerinde bulunan bu CO₂ hücrelerin metabolik ürünü olarak açığa çıkabilir ki bu

durumda kültür şişesinin kapağı sıkıca kapatılmalıdır veya CO₂'li atmosferi sağlamak amacıyla kullanılan CO₂'li etüvden kaynaklanabilir (118-120,131).

Sodyum fosfat ve potasyum fosfat gibi fosfat solüsyonları kültür ortamındaki pH'nın kontrolü için kullanılan diğer tampon solüsyonlarıdır (118). Fakat, bu fosfat tampon solüsyonlarının fizyolojik pH'yı tamponlama kapasiteleri oldukça azdır. Bu nedenle de sentetik bir tampon olan HEPES'in 10-25 mM konsantrasyonlarında besiyerine ilavesi pH dengesi için oldukça başarılı bulunmuştur. HEPES'in kullanılan bu konsantrasyonları hücre ve virüsler için toksik değildir. HEPES kullanımında ortamda CO₂ ile zenginleştirilmiş atmosfer gerekmemektedir. HEPES'in bu özelliği başta petri kutuları içinde yapılan hücre kültürleri olmak üzere tüm açık hücre kültürlerinin nemlendirilmiş ortamda inkübasyonunu sağlar. Bütün bunların sonucunda da pH stabilitesi için HEPES haricinde ki tüm tamponlar önemini yitirmiştir. Bir organik tampon olan Tris (hidroksimetil) amino metanın etkisi zayıf bulunmuştur (118-120,131).

2.5.7.4. Diğer Organik İyonlar

Hücre kültüründe hücrelerin gelişmeleri açısından Na⁺, K⁺, Mg⁺², Ca⁺², Fe, HCO₃, PO₄ ve SO₄ önemli iyonları oluştururlar. Bu iyonların hücre içi ve hücreler arası sıvıda çeşitli fonksiyonları vardır. Ca⁺² iyonu hücrenin stoplazmasının gelişiminde rol alırken, K⁺ iyonu hücre zarının potansiyeli için önemlidir (118,119).

Plazma membranının önemli bir kısmını kalsiyum oluşturur. Ca⁺² iyonu hücre zarında proteinler ve diğer anyonlarla birlikte bulunmuştur. Ca⁺² iyonunun büyük bir kısmı glikokaliks olarak adlandırılan ve eksternal bir kılıf olan ekstraselüler glikoprotein tabakası içinde bulunmaktadır. Ca⁺²'un % 90'ından fazlası plazma membranının bütünlüğü bozulmadan HeLa hücrelerinden EDTA ve Tripsin karışımıyla uzaklaştırılabilir. Ca⁺² ve Mg⁺² iyonları hücrelerin cam ve plastik gibi katı bir yüzeye yapışmasında önemli rol oynarlar. Çünkü bu iyonlar eksternal matriks ile negatif yüzey arasında köprü görevi yaparlar. Magnezyum, kofaktör olarak hücreler içersinde enzimatik reaksiyonlarda görev yapar. Bunun yanı sıra ribozomların bütünlüğünün devamı içinde magnezyum çok önemlidir (118,119).

2.5.7.5. Temel Metabolitler

2.5.7.5.1. Karbonhidratlar

Glukoz enerji kaynağı olarak kültür ortamında mutlaka bulunması gereken bir metabolittir. Fruktoz, mannoz, galaktoz ve bunların fosfatları glukoz yerine konulabilir (118,119,131).

2.5.7.5.2. Gazlar

Kültürler için gerekli olan gazlar O₂ ve CO₂'dir. CO₂ kültürde tampon görevi yapar. Bu nedenle de CO₂ bulunmadığı zaman hücre üremesi durur. Hücre kültürü için CO₂ çok önemli bir faktördür ve CO₂'siz yaşayabilen kültür yoktur (118,119,131).

2.5.7.5.3. Aminoasitler

Kültür ortamında mutlaka bulunması gereken esansiyel metabolitler sistin, tirozin, metiyonin ve fenil alanin gibi temel aminoasitlerdir. Bunun yanı sıra hücrelerin enerji ve karbon kaynağı olarak kullanılan ve nükleik asit sentezinde de rolü olan glutamine ihtiyacı vardır (118,119,131).

2.5.7.5.4. Vitaminler

Hücrelerin çoğalmaları için paraaminobenzoik asit, folik asit, piridoksin (piridoksal), B₆, B₂, B₁ (thiamin) olmak üzere B grubu vitaminleri gereklidir. Bu vitaminlerin çoğu metabolizma için gerekli olan koenzimlerinin temel yapısını oluşturur. Kültürde gerekli olan diğer vitaminlerin ise besiyeri içersine konulan serumdan karşılanabileceği düşünülür. Ancak düşük hücre yoğunluklarının kullanıldığı

klonlama çalışmalarında besiyerinde serum bulunsa da vitamin ilavesi gerekli olabilir (118,119,131).

2.5.7.5.5. Proteinler ve Peptidler

Protein ve peptidlerin hücre için in vitro fonksiyonları tam olarak belli olmamakla birlikte α Fetiun, fibronektin, LETS (Large External Transformation Substrate) ve CSP (Cell Surface Protein-Hücre Protein Yüzeyi) gibi bazı proteinlerin hücrelerin cam gibi katı bir yüzeye yapışmasını sağlaması, hücrelerin çoğalmasını hızlandırması ve bazı tampon görevleri olduğu bilinmektedir. Bazı proteinlerin mineraller, yağ asitleri ve hormonlar için taşıyıcı görevleri vardır. Bir protein olan transferin demiri bağlayarak daha az toksik olmasını sağlarken, α 2-makro globulin tripsini inhibe eder (118,119,131).

2.5.7.6. Destekleyici Proteinler

Hücreler destekleyici metabolitler olmadan da canlılığını sürdürebilirler. Ancak destekleyici metabolitler varlığında hücre kültürünün potansiyeli tam olarak açığa çıkar (118,119,131).

2.5.7.6.1. Aminoasitler

Ekim ortamına glisin eklenmesi büyük fayda sağlar. Eğer ekim için gerekli olan hücre sayısı çok az ise ortama serin ve prolin aminoasitleri eklenmelidir (118,119,131).

2.5.7.6.2. Vitaminler

Spesifik işlemler için kültür ortamında vitaminlerin bulunması gerekir. Örnek verilecek olunursa kirpikli silindirik epitel kültüründe kirpikli yapıyı görebilmek için ortama A vitamini koymak gerekir (118,119,131).

2.5.7.6.3. Nükleozitler

Kültür ortamına eklenmediklerinde hiçbir olumsuz etki olmamasına karşılık, nükleozitler ortama eklendiklerinde kültürün potansiyel gücü tam olarak ortaya çıkmaktadır (118,119,131).

2.5.7.6.4. Peptidler ve Ara Maddeler

Aminoasitler arasındaki dengesizliği gidermek başlıca görevleridir. Doğal pıhtı serumu normal seruma göre hücre proliferasyonunu daha çok artırır. Bunun nedeni daha çok pıhtılaşma esnasında trombositlerden (plateletlerden) salınan polipeptid olabilir. Mitojenik aktivite gösteren polipeptid gruplarından biri olan plateletlerden elde edilen büyüme faktörü (PDGF-Platelet Derived Growth Factor) büyük bir olasılıkla serumdaki majör büyüme faktörüdür. PDGF fibroblast ve glia hücrelerinin çoğalmasını uyarır (118,119,131).

2.5.7.6.5. Hormonlar

Hücreler üzerinde değişik etkilere sahip olan hormonların metabolik yollarda ki temel rolünü tanımlamak oldukça zordur. İnsülin glukoz ve aminoasitlerin hücrelere alınımını kolaylaştıran özelliği ile mitojenik bir etkiye sahiptir. Üreme faktörü 1 ve üreme faktörü 2 gibi insüline benzeyen bazı büyüme faktörleri hücre yüzeylerindeki insülin reseptörlerine bağlanarak benzer etki gösterirler. Serumlar içerisinde özellikle fetal

serumda bulunan büyüme hormonu somatomedinlere bağı olarak mitojenik etkiye sahip olur. Serum içersinde değişik oranlarda bulunan hidrokortizon hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlayarak hücre proliferasyonu arttırır. Fakat hidrokortizon yüksek hücre yoğunluğunda sitostatik olabilir ve hücre differensiyasyonunu stümüle edebilir. Kültür için serum içersinde bulunan diğer hormonlarda gerekli olabilir (118,119,131).

2.5.7.7. Enzimler

Hücrenin organizasyonunu sağlayan birinci tip enzimler, hücrenin ihtiyacı olsa da olmasa da yaptığı enzimlerdir. Hücrenin ortama adaptasyonlarını sağlayan ikinci tip enzimler ise hücrenin ihtiyacı olduğu zaman sentez ettiği enzimlerdir (118,119,131).

2.5.8. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

Hücrelerin in vitro şartlarda üretilmeleri ve subkültürlerinin yapılabilmelerinin bulunmasıyla bu alanda geliştirilen çalışmalar hücrelerin üretilmesi daha uygun besiyerlerinin sağlanması ve embriyo ekstraktları, protein hidrolizatları lenfe benzer besiyerlerinin hazırlanmasına yönelmiştir (118,119).

Çok çeşitli hücre tipleri için modife edilmiş birçok sentetik besiyeri geliştirilmiştir. Hücre kültür laboratuvarında en çok kullanılan sentetik besiyeri Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 'dur. EMEM'un bir modifikasyonu olan Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) kullanılan daha zengin diğer bir besiyeridir. Basit bir besiyeri; dengeli tuz solusyonu, temel aminoasitler, vitaminler ve diğer besleyici maddelerden oluşur. Besiyeri içersine hücrelerin gelişmeleri ve çoğalmaları için %5-10, hücrelerinin en düşük seviyede aktivitelerini sürdürüp canlılıklarının devamı için ise %2 oranında hayvan serumu ilave etmek yeterli olmaktadır (118,119).

Medium 199 ve Raswall Park Memorial Institute (RPMI) hücre kültür laboratuvarlarında kullanılan diğer önemli besiyerleridir. Bu besiyerlerinin tümü ticari olarak satılmaktadır. Daha çok steril bir şekilde satın alınmaktadır. Bu besiyerleri toz

halde ticari olarak satılmakla birlikte bunların steril bir şekilde hazırlanmaları oldukça zordur. Besiyerlerini steril etmek için 0.22 µm olan filtre sistemlerinden faydalanır (118,119).

2.5.8.1. EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium)

Hücrelerin üremesi ve devamlılığının sağlanması kullanılan temel bir besiyeridir. BSS (Balanced salt solution-Dengeli tuz solüsyonu) veya HBSS (Hank's BSS) içerisinde 12 temel aminoasit, 7 temel vitamin, glikoz, tuz, bikarbonat tampon sistemi ve fenol red bulunur. Bu besiyerlerinin ticari olarak 1x ve 10x solüsyonu temin edilebilir ve bu besiyeri uzun süre saklanabilir. Bu besiyerinde glutamin bulunmaz. Bu besiyerine kullanılmadan önce serum, sodyum bikarbonat ve glutamin gibi maddeler katılmalıdır. Hücre kültürleri için L-glutamin temel bir aminoasittir. L-glutamin besiyerine final konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde eklenir. Sıvı haldeki besiyerlerinde L-glutamin bulunmazken toz haldeki besiyerlerinde genellikle bulunur. Ayrıca hücre kültürlerine bağlı olarak besiyerlerinde L-glutamin konsantrasyonu artırılabilir. Ticari olarak satılan besiyerlerinde hücrelerin üremeleri için gerekli olan aminoasit ve vitaminler bulunmaktadır. Bazı özel çalışmalar için gerekli olduğu durumlarda ticari olarak temin edilen aminoasit karışımları besiyerlerine eklenebilir (118,119,131).

2.5.8.2. Serum

Albumin, globulin, üreme uyarıcıları ve üreme inhibitörlerinin bulunduğu serum son derece zengin bir kaynaktır. Hücrelerin gelişmesi için önemli olan komponentler serumda α-globulin fraksiyonunda yer alır. Serumda hücrelerin üremesini stimüle eden insülin, glukokortikoidler (hidrokortizon, deksametazon) ve tiroid hormonları gibi hormonal faktörler ile hücrelerin yüzeye tutulmasını ve yayılmasını sağlayan fibronektin, fetuin gibi proteinler, kortizol, hormonlar, Fe⁺², Zn⁺², Cu⁺² gibi mineraller, prostoglandinler, kolesterol ve linoleik asit gibi lipitleri taşıyan albumin ve transferrin

benzeri proteinler bulunur. Serumda DNA sentezini ve hücre bölünmesini stimüle eden fibroblast üreme faktörü ve epidermal üreme faktörü gibi faktörler bulunur. Ayrıca serumun tripsin aktivitesini inhibe etmesi, bakteri toksinleri gibi bazı inhibitör bileşiklerin detoksifikasyonu ve hücre mebranından substratların transportu gibi görevleri vardır (118,119,131).

Hanks gibi dengeli tuz solüsyonları içersine sadece serum, laktalbumin hidrolizat ya da diğer bileşenler eklendiğinde hücre üremesini sağlarlar. Serumda esansiyel aminoasitler, nükleikasit prekürsörleri, hormonlar ve yağ asitleri bulunur. Serum hücrelerin ayrıştırılması için kullanılan proteazları da inhibe eder. Hücre üremesi için genellikle % 5-15 konsantrasyonlarda, tek tabakalı hücre kültürlerinin devamı için ise % 0-2 konsantrasyonlarda fetal ya da yeni doğan buzağı serumu kullanılır. İnsan, dana ve at serumu en fazla kullanılan serumlar arasındadır. Zor üreyen hücreler için Fetal Sığır Serum (FCS) kullanılması tavsiye edilir. FCS yüksek oranlarda biyotin ihtiva eder. EMEM gibi bazı besiyerlerinde biyotin olmadığından dolayı FCS kullanımı uygun olur (118,119,131).

Doku kültürlerine eklenen serumlar mikoplazma kontaminasyonu açısından en önemli kaynaktır. Bu nedenle serumların kullanılmadan önce sitotoksik etkileri yönünden kontrolünün yapılması gerekmektedir. Satın alınacak hazır serumlar hücreleri üretmesi yönünden test edilmelidir. Serumlar -70 °C'de saklanmalıdır (131).

Hücrelerin gelişimleri için besiyerlerine % 7,5-10 FBS (Fetal Bovin Serum) eklenirken, metabolik aktivitelerinin devamı için ise % 2 oranında FBS yeterlidir. Genellikle kullanılan serumlar insan veya hayvan serumu olmakla birlikte tercih edilen FBS' dur. Erişkin serumlarında hücrelerin çoğalmalarını önleyen birçok enfeksiyöz ajan bulunabileceğinden dolayı tercih sebebi olmayabilir. Ayrıca hayvan serumu kullanılacaksa hayvan genç ve sağlıklı olmalıdır. Serumdaki bazı maddeler ısıtılarak inaktive edilir. Ticari olarak temin edilebilen ve hormonlar ve matriks proteinleri gibi serum yerine geçebilen bazı maddelerin kullanılmasıyla besiyerlerine eklenmesi gerekli olan FBS'un miktarı azaltılabilir. Sonuçta bu maddelerin kullanılması FBS'un kullanılmasından daha ekonomiktir. İn vitro şartlarda organ ve hücre fonksiyonlarını düzenleyen endokrin faktörleri saptamak ve antikor purifikasyonu için ucuz ve pratik olan serumsuz kültürleri kullanmak oldukça avantaj sağlar. Serumlu besiyerlerinin kullanımının ise sahip olduğu bazı dezavantajları vardır. Serumun yapısında zamanla

bozulmalar olabilir ve serumlar en fazla bir yıl saklanabilir. Eğer birden fazla hücre tipi kullanılacaksa bunların her biri için farklı serum gerekebilir. Buda çok sayıda serumun aynı anda saklanması anlamına gelir. Sonuçta aynı anda birden fazla serum tipinin kullanılması bazı problemler yaratabilir. Serumlu besiyerlerinin kullanımının bir dezavantajı ise serumda hücrelerin üremesi üzerine inhibitör etkileri tam olarak bilinmeyen birçok maddenin bulunmasıdır (118,119,131).

2.5.8.3. Hepes

Hücre kültürü besiyerinde sıklıkla kullanılan bir organik tampondur. Sodyum bikarbonatın pH'yı tamponlama kapasitesi sınırlı olduğundan dolayı içerisinde hem HEPES, hem de sodyum bikarbonat bulunan besiyerleri sadece HEPES bulunan besiyerlerinden daha etkili olarak tamponlanmışlardır. Besiyerlerine meydana gelebilecek pH değişimlerini durdurmak amacıyla final konsantrasyon 10-25 mM HEPES ilave etmek yeterli olacaktır. Kullanılan sodyum bikarbonat ve HEPES konsantrasyonları besiyerinin çeşidine göre değişmektedir. Eğer CO₂ kullanılacaksa o zaman besiyerinde HEPES'in konsantrasyonu sodyum bikarbonatın konsantrasyonunun iki katından daha fazla olmalıdır. Hem açık, hem de kapalı kültür kapları için HEPES ilave edilmiş besiyerleri kullanılabilir (118,119,131).

2.5.8.4. De-İyonize Su

Besiyerleri ve besiyerlerine eklenecek olan maddeler sterilize edilmiş de-iyonize su ile hazırlanır. Başarılı bir kültür sistemi için kültürde kullanılacak suyun minerallerinin olmaması gerekir. Laboratuvarlarda suyun de-iyonizasyonunda ve distilizasyonunda problem olmaması gerekir (131).

2.5.8.5. Dengeli Tuz Solüsyonu

İster HBSS (Hank's BSS), isterse EBSS (Earle's BSS) olsun BSS inorganik tuzlar ve sodyum bikarbonat tampon sisteminden oluşur. BSS'ler temel besiyeri içerisinde fizyolojik şartlarda osmotik basınç ve pH'nın devam ettirilebilmesi için izotonik çözeltiler olarak kullanılır. Hatta BSS viral transport besiyerinde diluent ve komponent olarak sıklıkla kullanılmaktadır (118,119,131).

Sodyum bikarbonat tamponlayıcı görevinin olmasının yanında besleyici görevi de vardır ve birçok hücre içinde gereklidir. BSS glukozda bulunmaktadır. HBSS'li besiyerlerinde sodyum bikarbonat düşük miktarlarda bulunur ve kapalı sistemler için kullanılır. Yani burada kültür şişesinin ağzı sıkıca kapatılmalıdır. Açık sistemlerde ise içerisinde yüksek dozda sodyum bikarbonat bulunan EBSS besiyerleri kullanılır. Burada kültür şişesinin kapağı gevşek bırakılır ve bu kültürler % 5'lik CO₂'li ortamlarda inkübe edilmelidir. CO₂'li ortamlarda inkübasyon sırasında kültür kapları kapaklarının gevşek bırakılmaları dikkat edilmesi gereken önemli bir noktadır (118,131).

2.5.8.6. Fenol Red

Hücre kültürü besiyerlerinde pH indikatörü olarak BSS içerisinde 10-20 mg/lt fenol red konulmalıdır. Hücre soylarının çoğu açık pembe renkli pH:7.2-7.4'deki besiyerlerinde ürerler. Hücrelerin gelişmesi ve çoğalması sonucunda kültür besiyerinin rengi pembeden (pH:7.4), portakal (pH:7.0) ya da sarımsı bir renge (pH:6.5) döner. Bu renk değişimi aşırı derecede asit üretimi sonucunda oluşur. Bu durumda kültürlerin üzerine ya yeni besiyeri konulmalı ya da hücrelerin pasajlanması gerekir. Kültür besiyerleri genelde mavimsi kırmızı (pH:7.6) ya da mor (pH:7.8) rengi aldığı anda alkalileşmiştir. Bu durumda ya tamponlama sistemi çalışmamaktadır ya da hücre metabolizmaları uygun değildir. Öyleyse yapılması gereken derhal kültür besiyerinin değiştirilmesidir. Ayrıca besiyerlerinde kullanılan indikatörler kültüre edilmiş

hücrelerin gelişiminin makroskopik olarak incelenmesine olanak sağlamaktadır (118,131).

2.5.8.7. Antibiyotikler

Kültür ortamındaki bakteri ve mantar kontaminasyonunu önlemek için besiyerine antibiyotikler ilave edilir. Kontaminasyon amaçlı kullanılan antibiyotikler antibakteriyel ajanlar ve antimikotikler olmak üzere iki grup altında incelenebilir. Bakteri ve mantar kontaminasyonunu kontrol edebilmek amacıyla hücre kültürü besiyerine antibakteriyel ve antimikrobiyal ajanlar katılmalıdır. Genellikle kültürlerde antimikrobiyal ajanların çeşitli kombinasyonları kullanılır. Bu antimikrobiyal kombinasyonlar steril olarak ticari şartlarda temin edilebilir. Ancak burada antimikrobiyal ajanların hücreye olabilecek toksik etkilerinin de göz ardı etmemek gerekmektedir. Örneğin doku kültürlerinde penisilin kullanımı bakterilerin L-formunun ortaya çıkmasına neden olur (118,119,131).

Antibiyotik kullanımında bir başka dezavantaj ise bakteri veya mantar infeksiyonunu baskılayarak, kültürde kronik ya da latent bir infeksiyonun sürmesine neden olmaktadır. Antimikrobiyal ajanlar dokulardan hücrelerin ayrıştırılması esnasında ya da klinik numunelerin kültüre inokulasyonu gibi yüksek kontaminasyon riski olan durumlarda kesinlikle kullanılmalıdır. Ancak hücre kültürlerinin subkültürleri esnasında antimikrobiyal ajanların kullanımından kaçınılmalıdır. Böyle durumlarda mikrobiyal risk aseptik teknikler kullanılarak ortadan kaldırılmalıdır. Sonuçta mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için yüksek oranlarda antibiyotik kullanılmamalıdır. Laboratuvarlarda gelişigüzel antibiyotik kullanımı da önlenmelidir. Aksi takdirde bakteri ve mikoplazmaların direçli suşları oluşabilir (118,119,131).

Sıklıkla geniş spektrumlu antibiyotiklerin streptomisin, penisilin ve amfoterisin B (fungizone) ya da gentamisin, ampoterisin B ve Nystatin (10 U/ml) kombinasyonları kullanılmaktadır. Laboratuvarlar da antibiyotikler koruyucu ajanlar olarak kullanılmaktadır. Rutin olarak kullanılan antibiyotiklerin kullanımına kontamine olan kültürlerin tespiti için zaman zaman ara verilmelidir (118,131).

2.5.8.7.1. Penisilin

Hücre kültür besiyerine 0.2-1.5 unit/mL oranında konulan penisilin Gram pozitif bakterilerinin çoğunun üremesini durdurur. Gram negatif bakterilerin üremesinin durması için ise daha yüksek konsantrasyonlarda penisiline ihtiyaç vardır. Hücre kültür besiyerine 50 unit/mL penisilin konulması Gram negatif bakterilerinin üremesini durdurur. Kontaminasyon varlığında ise hücre kültür besiyerine 100 unit/mL penisilin G konulması tavsiye edilir. Eğer penisilin besiyerinde yüksek dozda kullanılması gerekiyorsa, o zaman penisilin 37 °C'de 2 gün inkübasyon ile inaktive edilir. Penisilin solüsyonları 0,22 µm'lik nitroselüloz filtrelerden geçirilerek steril edilir (118,131).

2.5.8.7.2. Streptomisin

Streptomisin sülfat ve dihidrostreptomisin Gram negatif bakterilerin üremelerini etkin bir şekilde baskılar. Bu nedenle hücre kültürlerine hücrelerin üremesini engellemeyecek oranlarda eklenmesi tavsiye edilir. Etkin bir koruma için mililitreye 100 mg streptomisin sülfat yada dihidrostreptomisin katılması yeterlidir. Hücre kültürlerinde streptomisin sülfatın yarılanma ömrü 4 gün iken, dihidrostreptomisin 37 °C'de aylarca stabil olarak kalabilir. Bu antibiyotik solüsyonu da penisilin solüsyonunda olduğu gibi filtrasyonla steril edilir (118,131).

2.5.8.7.3. Gentamisin

Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin üremelerini önleyen gentamisin hücre kültürlerinde oldukça kullanılan bir antibiyotiktir. Gentamisin aynı zamanda hücre kültürleri için büyük bir problem teşkil eden mikoplazma kontaminasyonu içinde koruyucu bir antibiyotiktir. Gentamisin solüsyonu otoklavda steril edilebilir. Gentamisin tavsye edilen kullanma konsantrasyonu 50-100 mg/ml' dir ve en az 15 gün 37 °C' de etkinliğini korur (118,131).

2.5.8.7.4. Diğer antibiyotikler

Kültür besiyerinin mililitresi başına klorotetrasiklin hidroklorid solüsyonundan 5 mg ilave edilirken, kanamisin ve polimiksin B solüsyonlarından 10 mg ilave etmek yeterlidir. Klorotetrasiklin hidroklorid solüsyonu 100x olarak hazırlanır ve kullanılacağı zaman 99 ml kültür besiyerine 1 ml eklenir. Aynı şekilde kanamisin ve polimiksin B solüsyonları da 100x olarak hazırlanır ve kullanılacağı zaman 99 ml kültür besiyerine 1 ml eklenir. Kültür besiyerinde vankomiksin kullanılacaksa mililitre başına 100 mg ilave edilir (118,131).

2.5.8.7.5. Antimikotikler

Fungizone sıvı besiyeri içersinde çözünmüş olan ampoterisin B'nin sodyumdeoksikat kompleksidir. Fungizone birçok maya ve mantarın üremelerini etkili bir biçimde baskılar. Fungizone ilk defa 1958 yılında Hempehill ve arkadaşları tarafından maya ve küf mantarlarının üremesini inhibe etmek amacıyla kullanılmıştır (132). Fungizone kültürde hücrelerin üremesini engellemeyecek konsantrasyonlar da kullanılması tavsiye edilir. Kültür besiyerinin mililitresi başına 20 µg konulan fungizone hücrelere zarar vermeksizin maya ve küf mantarlarının üremelerinin önler. Kültür besiyeri içersinde 37 °C' de çok yavaş bir şekilde inaktive olan fungizonenin yarılanma ömrü 4 gün civarındadır (118,131).

2.5.9. Besiyerleri ve Hücre Kültürlerine Mikrobiyal Kontaminasyon Açısından Çeşitli Kontrol Testlerinin Uygulanması

Birçok mikroorganizma besiyerleri ve hücre kültürlerinde kontaminasyona neden olabilir. Hücrelerin izole edildiği dokular, serumlar, besiyerleri ve çözeltiler, çalışan kişiler ve çevre kontaminasyona neden olan kaynakları oluşturur. Bakteri ve mantarın neden olabileceği kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla şu aşamalar uygulanır (131,133,137,138):

1. Yeni hazırlanmış besiyerinin antibiyotik ilavesi yapılmadan önce %2-5 kadarı alınıp oda ısısında veya 35 °C de 7 gün inkübasyona bırakılır.

2. Bu örneklerden 1 ml alınarak thioglycollate'lı buyyon ve sabouraud'un sıvı besiyerine (SLM) inoküle edilir. Bunu yanı sıra kanlı agar, sabouraud agar ve deoxycholate agar besiyerlerine de bu örneklerden ekim yapılır.

3. Eğer hücre kültürünün kontaminasyonundan şüpheleniliyorsa hücreler besiyerinden uzaklaştırılarak süspansiyon inokulum gibi kullanılır.

4. Ekimi yapılan SLM tüplerinin bir kısmı oda sıcaklığında inkübe edilirken, bir kısmı da 35 °C de inkübe edilmelidir. Ekimi yapılan thioglycollate'lı buyyon tüpleri ve kanlı agar plakları ise sadece 35 °C de inkübe edilmelidir. Tüm kültürlerin 14 gün boyunca her gün takibi yapılmalıdır. Mikoplazmalar karakteristik olarak hücre duvarları olmayan çok küçük (0.25-1.0 µm) mikroorganizmalardır. Mikoplazmalar hücre kültürü açısından çok büyük problem teşkil ederler. Laboratuvar şartlarında çalışma sırasında veya kültür besiyerlerinin bir tamamlayıcısı olarak kullanılan serumlar içerisinde oldukça fazla bulunabilen mikoplazmalar kontaminasyona neden olabilirler (131,133).

Mikoplazmalar bazen kültür besiyerinde hiçbir değişikliğe yol açmayarak kendini belli etmezken, bazen de hücrelerde sitopatojenik etkiler oluşturabilir. Mikoplazmalar hücre sel çevreye oldukça iyi adapte olurlar. Bu nedenle de mikoplazmayı kontrol etmede kullanılan kültür metotları tam olarak güvenilir değildir. Bunun sonucunda bu kültür metotlarına ek olarak morfolojik metotlar ve daha çok tercih edilen biyokimyasal metotlar mikoplazmayı tespit etmede kullanılmalıdır (131,139).

2.5.10. Hücre Kültürlerinde Kullanılan Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Günümüzde modern laboratuvarlarda kullanılan etkili ve önemli kriyoprezervasyon yöntemleri hücrelerin sıvı azotta (-196 °C'de) dondurularak saklanması temeline dayanır. Hücrelerin dondurulmaları ve çözümleri esnasında hücre içerisinde buz kristallerinin oluştuğu ve osmotik basıncın hücreler üzerinde öldürücü etkisi olduğu bilinmektedir. Dimetil sülfoksit (DMSO) ve gliserol gibi kriyoprotektif

maddelerin kullanılmasıyla birlikte uygun bir dondurma ve çözme metodunun izlenmesi hücrelerde meydana gelebilecek hasarı en aza indirmektedir (127,130).

Hücrelerin kriyoprezervasyonunda en başarılı sonuçlar dakikada hızı 1 °C'de soğutma yapabilen programlı dondurma cihazları kullanılarak alınmıştır. Hücrelerin kriyoprezervasyonunun yararları arasında elde edilmesi zor olan primer ve devamlı hücrelerin kontaminasyon ya da bozulmasını engelleyerek saklanabilmesi, Hep-2, HeLa ve WI-38 gibi diğer hücrelerden çok daha fazla kontaminasyona duyarlı hücre dizilerinin bozulmadan devamlılığının sağlanabilmesi sayılabilir. Hayvan hücrelerinin kriyoprezervasyonunda alınan en başarılı sonuçta uygulanan teknoloji rutin olarak kullanılmaktadır. Hücrelerin -130 °C'nin altındaki bir sıcaklıkta bozulmadan saklanabilmesi mümkün olmaktadır (127,130,131).

Hücrelerin istenildiği her zaman bulunamaması ve bundan ötürüde kullanılamamasından kaynaklanan problemler, pratik olarak kolay yapılabilen in vitro üretilen kültür hücrelerinin dondurularak saklanması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Kültür hücrelerinin dondurularak saklanmasında kullanılan ilk teknik, sığırcılıkta uygulanan sperm hücrelerinin kriyoprezervasyonunda olduğu gibi hücre süspansiyonuna bir kriyoprotektan maddenin katılmasıyla yapılmıştır (118,127,130).

1954 yılında Scherer ve Syverton, HeLa ve L-Strain mouse fibroblast devamlı hücre kültürlerinin saklama besiyerlerine gliserol katarak -60 °C ve -70 °C'lerde saklanabileceğini göstermişlerdir (126). Araştırmacılar -25 °C'den -70 °C'ye hücrelerin direkt olarak konulduğunda, oluşan bu sıcaklık farkından hücrelerin ciddi olarak etkilenmeyeceğini ispatlamışlardır. Hücreler -190 °C' de tüm biyokimyasal reaksiyonları tamamen durduğu için sıvı azot içerisinde daha iyi şartlar da ve uzun sürelerde saklanmaktadır (118,131).

Daha sonraki yıllarda birçok hücre çeşidi için uygun bir kriyoprotektan madde olan DMSO keşfedilmiştir. DMSO hücre dışına ve hücre içine oldukça hızlı bir şekilde diffüze olabilmektedir. Bu özellikte hücre prezervasyonu için oldukça önemlidir. Bu sayede dondurma işlemleri sırasında hücre hasarına neden olabilecek osmotik şok en aza indirilmektedir. DMSO çok etkin bir kriyoprotektan madde olup, özellikle fibroblast benzeri hücreler ve lenfositler başarılı bir şekilde dondurulmaktadır. Eğer hücreler kriyoprotektan maddeler konulmadan dondurulacaksa 0 °C'den -25 °C sıcaklığa çok yavaş bir hızda geçiş yapılmalıdır. Çünkü hücreler hızlı bir şekilde dondurulduğu

taktirde hücrelerin intraselüler sıvısı donacak ve geniş çapta buz kristalleri oluşacaktır. Bu geçiş fazı da fiziksel olarak hücre membranlarının patlamasına ve hücre ölümlerine yol açmaktadır. Diğer yandan da hücrelerin yavaş dondurulması sırasında hücrelerdeki nükleer yapı hücre dışındaki sıvı faz gibi aşırı şekilde soğur. Bu da hücre içinden suyun çekilmesiyle beraber aşırı derece de tuz konsantrasyonlarının oluşmasına neden olur. Bunun için kullanılan kriyoprotektan maddeler hücre içine hızlı bir şekilde diffüz ederek su dengesini koruyarak tuz oluşumunu engeller. Sonuçta hücreler osmotik şoktan kurtulmuş olur. Kısaca özetlemek gerekirse kriyoprotektan maddeler dondurma ve çözme işlemleri sırasında suyu bağlayarak hücre içerisindeki elektrolit miktarını ve mevcut suyun buz kristallerine dönüşmesini azaltır (118,131).

Hücreler $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de dondurma cihazları kullanılarak kısa sürelerde muhafaza edilebilir. Hücreler sıvı azot içerisinde ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) veya azot buharında ($-120\text{ }^{\circ}\text{C}$) da saklanabilirler. Kullanılan sıvı azot soğutucuları sadece çok düşük bir sıcaklık ortamı sağlamakla kalmayıp aynı zamanda bu mekanik soğutucular muhafaza edilmesi zor olan örneklerin uzun yıllar saklanabilmesine olanak sağlarlar. Tüm bu işlemler sırasında iki önemli noktaya dikkat edilmelidir. Bunlardan birincisi kriyoprezervasyon sırasında kapakları iyi kapanmayan kriyotüplerin içine sızan azotun meydana getirebileceği tehlikedir. Bu şekilde olan bir kriyotüpün çözülmesi sırasında, kriyotüpün içinde hapsedilen azotun buharlaşması sonucunda meydana gelebilecek patlama çalışan kişilerde yaralanmaları neden olabilir. Bütün bunlar göz önünde bulundurularak örnekler sıvı azot içinde saklanmaya uygun tüplere konmalıdır. Bunun için her $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de yaklaşık 32×10^{-7} mm civarında genleşebilen borosilikatı tüpler kullanılmalıdır. Bu tüpler kapakları kapatıldıktan sonra % 0.1'lik metilen mavisi ile doldurulmuş beher içerisinde $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dak. tutulmalıdır. Bu tutulan süre kriyoprotektan maddenin süspansiyonda dengelenmesi açısından oldukça önemlidir. Kriyotüpler metilen mavisi bulunan beher içerisinde $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dak. bekletildikten sonra soğuk çeşme suyu ile yıkanır. Tüpler tamamen kurutulduktan sonra dondurma işlemine başlanır. Bunun yanı sıra kapakları yanlış kapatılmış tüpler bu süre sonunda kolayca tespit edilebilir. Çünkü hatalı kapatılmış tüplerin içinin mavi renk aldığı görünür ve bu mavi boyanmış tüpler kullanılmaz. Bu şekildeki tüpler kesinlikle azot tankına güvenlik açısından konmamalıdır (118,131).

2.5.10.1. Dondurulmuş Hücrelerin Çözünmesi

Sıvı azot tankından çıkarılan kriyotüpler daha önceden hazırlanmış olan 37 °C de su banyosuna direk olarak daldırılır ve kolayca erimesi için çalkalanır. Çözünme olayı yaklaşık olarak 40-60 saniye içerisinde gerçekleşir. Su banyosundan çıkarılan kriyotüplerin etrafı %70'lik alkol ile iyice silinir. Kriyotüpün kapağı açıldıktan sonra içindeki çözünmüş hücre süspansiyonu, pastör pipeti veya bir şırınga yardımıyla alınarak pH'sı 7,2 olan ve içersinde % 10 FCS bulunan hücre üretme besiyerine konulur. Kriyoprotektan maddenin ortamdan atılması için kültürün besiyeri ertesi gün değiştirilmelidir. Ya da kriyotüpteki hücre süspansiyonu bir santrifüj tüpüne aktararak üzerine hücre canlılığı açısından oldukça önemli olduğu için bekletmeden 10 ml kadar üretme besiyeri konulur ve santrifüj edilir. Üstteki sıvı uzaklaştırılır. Altta kalan hücre çökeltisi hücre besiyeri ile süspanse edilerek inkübasyona bırakılır (118,131).

2.5.10.2. Hücre Canlılığının Tespit Edilmesi

Tripan mavisi ve Erythrocin B gibi ölü hücrelerin boyanmasını sağlayan boyalar aracılığıyla süspansiyondaki hücrelerin canlılığı tespit edilir. Erythrocin B ile yapılan boyamalarda mikrobiyal üreme ve çökeltiler daha çabuk görülebilmektedir. Erythrocin B ile boyama da kullanılan standart bir yöntem olmamakla beraber şu şekilde yapılır. Eğer dondurulmuş hücrelerin boyanıp sayılmaları düşünülüyorsa o zaman krotüpündeki hücre örneğinin % 5'inin alınarak boyanması tavsiye edilir. Bu işlem iki adımda gerçekleşir. Hücreler boyama solüsyonuyla çeşitli oranlarda sulandırılır. 100 ml PBS içerisinde 100 mg Erythrocin B çözülerek 1 M NaOH ile pH 7.2-7.4'e ayarlanır. Doğru ve kolay bir sayım için final yoğunluk $0,3-2 \times 10^6$ hücre/ml olmalıdır. Sayma işlemi hücre süspansiyonuyla boyanın karıştırılmasından 1-5 dak. sonra yapılmalıdır. Bir örnekten birkaç kez boyama yapılarak sayım yapmak daha doğru ve emin sonuçlar verecektir (118-120,134).

2.5.10.3. Dondurma İşleminde Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

Donmuş kriyotüpleri çözerken mutlaka eldiven ve koruyucu gözlük takılmalıdır. Patojen örnekler içeren tüpler kapalı kaplarda çözülmelidir. Meydana gelebilecek tüp patlamalarını önlemek için tüpler çözülmeden 24 saat önce sıvı azot içinden alınarak azot buharına konulmalıdır. Başarılı bir kriyoprezervasyonun yapılabilmesi için hücre tiplerine göre önemli olan epidermal üreme faktörü ya da interlökinler gibi faktörlere dikkat edilmesi gerekir (118,119).

Kültürlerde hücrelerin tekrar canlandırma sırasında bir kısmı ölmektedir. Ayrıca hücre miktarındaki artışa bağlı olarak meydana gelen toksik ürünlerin birikmesiyle de hücrelerin ölümünde artma olabileceği unutulmamalıdır. Hücrelerin çözülmesi sırasında solüsyondan CO₂'in ayrılmasıyla pH problemi ortaya çıkabilmektedir. Hücre membranları daha çok alkali pH' da bozulabilir. Çözme esnasında oluşan ve geniş çapta hücre ölümlerine yol açabilen alkali pH problemi hücrelerin kriyoprezervasyonu esnasında solüsyona yüksek oranlarda serum katılmasıyla çözülebilir. Başka alternatif çözüm ise hücreleri kriyoprotektan ve serum karışımı içerisinde dondurularak saklamaktır. Sonuçta stabil bir pH için ortamda yüksek protein konsantrasyonu sağlanmalıdır (118,119).

Kriyoprezervasyonda daha çok taze olarak hazırlanmış dondurma karışımları tercih edilir. Ticari kaynaklardan temin edilen DMSO kullanılmadan önce 0.22 µm fitrelerden geçirilerek steril edilir. Kullanılacak DMSO miktarları cam kaplara konularak -20 °C saklanır. Bu olay DMSO'nin oksidasyon problemini ortadan kaldırmaktadır. İnsan promyelocytic leukemia hücre soyu HL 60'da olduğu gibi differensiyasyona neden olan durumlarda DMSO yerine gliserol kullanılmalıdır (118,119).

2.5.10.4. Sıvı Azot Tankları

Sıvı azot soğutucuları azot tüketimi, saklama kapasiteleri ve kullanım kolaylığı dikkate alınarak seçilmelidir. Azot tüketimi açısından dar ağızlı azot tankları genellikle daha ekonomiktir. Fakat kullanım açısından geniş modeller daha uygundur. Kriyotüpler

sıvı azot içersinde daldırılarak ya da azot buharında saklanabilir. Kriyotüpleri azot buharında saklamak hatalı kapatılmış tüplerin içersine sıvı azotun girmesi önlendiği için patlama tehlikelerinin ortadan kaldırmaktadır. Fakat kriyotüplerin uzun süreli azot buharında saklamak bazı dezavantajlara neden olur. Tankın bir yerden bir yere rahatlıkla götürülebilmesi için hareketli bir taban, azot seviyesini gösteren bir alarm sistemi, büyük tanklar için tankın kullanılmasında büyük kolaylık sağlayan raf sistemi gibi yardımcı aksesuarlar çalışmalarda oldukça kolaylıklar sağlamaktadır. Tanktaki azot seviyesini tespit etmek amacıyla kullanılan otomatik alarm sistemi kullanılsa da yine de düzenli olarak bir çubuk daldırılarak azot seviyesi kontrol edilmelidir. Çünkü elektronik göstergeler bazen kullanıcıyı yanıltabilmektedir (118,119).

2.5.11. 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 (118-120).

Kültüre hücrelerin bu avantajından yararlanılarak biyokimyasal ve genetik analizler yapılmaktadır (118-120).

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 (118-120,128).

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 (118-120,127).

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 (118-120,127).

Sonuç olarak, hücre kültürleri genetik çalışmaların yapılabilmesini sağlar. Karışık genotipli hücre dizileri sağlayan teknikler vardır (118).

Kültüre hücrelerin kullanımında belli başlı iki dezavantajdan biri ilgili fenotipin eksprese olamaması, diğeri ise kültür hücrelerinin değişkenlik kaynağı oluşturabilmesidir (118,119).

2.5.12. 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 (135,136).

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 süspanse edilmesi ve dilüe edilmesi gerekir. Harici standartlar gerektiren çalışmalarda var olan doğrulukta, floresans boyalar kullanılarak az sayıda hücrede DNA ölçülebilir (137,138).

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

Cilt yaşlanmasına sebep olan 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 (139,140).

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 (139,140). 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 (141,142).

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 (143).

Tüm bunlar göz önüne alınarak tez çalışmamızda, Türkiye piyasasında yer alan anti-aging preparatların etkinliğinin embriyonal fare fibroblast hücreleri kullanılarak incelenmesine karar verilmiştir (144).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 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.)
- Tetrametoksiopropan (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.)

3.1.2. 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)
- Enjektör ucu

- 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

3.1.3. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- (-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.)
- Etüv: Binder (Almanya)
- Hassas Terazı: Mettler Toledo (Almanya)
- Hassas Terazı: Ohaus (Çin)
- Homojenizatör: Ika- Ultra turrax (Almanya)
- Işık mikroskobu: Olympus (Astoria, New York, A.B.D.)
- Işık mikroskobu: Nikon (Japonya)
- İnverted 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 Mikrosantrifüj: 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)

3.1.4. Hücre Dizileri

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

3.1.5. Çalışmada kullanılan Anti-aging Kremler

Çalışmada uluslar arası alanda tanınmış farklı iki lider kozmetik firmasına ait piyasa ürünü 4 adet anti-aging krem kullanmış olup bu kremlere randomize olarak 1'den 4'e kadar (N1-N4) numaralar verilmiştir. Bu firmalar, kozmetik ürünlerde yasal gereklilikler uyarınca in vivo etkinlik ve güvenlik testlerini uygulayan firmalar oldukları için seçilmiştir. Böylece, hücre kültürü çalışmasının istenen düzeyde sonuç verip vermediğini tespit etme imkanı olacaktır. N1 ve N2 kodlu kremler aynı firmaya ait, N3 ve N4 kodlu kremler ise bir başka firmaya ait ürünlerdi. N1 ve N3 kodlu kremler gündüz kremi, N2 ve N4 kodlu kremler ise gece kremi özelliğindedir.

3.1.5.1. Çalışmada Kullanılan Anti-aging Kremlerin İçerikleri

Çalışmada kullanılan kremlerin içeriklerinin belirlenmesinde iç ve dış ambalaj materyallerinin üzerindeki bilgiler esas alınmıştır. Buna göre çalışmada kullanılan kremlerin muhteviyatları aşağıdaki belirtilmiştir.

a) N1 kodlu Anti-aging Kreminin İçeriği

Su, bütülen glikol, hidrojene polidesen, hidrojene polisobuten, C12-15 alkil benzoat, stearik asit, setearil alkol, gliserin/ palmitoil tripeptid-5, hyalorinik asit, dimetikon, hidrolize inci, deniz suyu, *Laminaria japonica* (konbu) ekstresi, *Angelica keiskei* (ashitaba) yaprak/kök ekstresi, *Aloe ferox* (sarısabır) ekstresi, *Laminaria digitata* (deniz yosunu) ekstresi, glikozil trehaloz/ hidrojene nişasta hidrolizatı, propilen glikol, *Saccharomyces* lizat ekstresi, polisorbat 60, metilparaben, gliseril stearat SE, PEG 100 stearat, parfüm, arjinin, *Oryza sativa* (pirinç) kallus kültür ekstresi, *Zanthoxylum piperitum* (Japon biberi) ekstresi, *Pulsatilla koreana* (kore köknarı) ekstresi, *Usnea barbata* (sakal likeni) ekstresi, akrilatlar/ C10-30 akril akrilat çapraz polimerleri, propilparaben ve allantoin.

b) N2 kodlu Anti-aging Kreminin İçeriği

Su, C12-15 alkil benzoat, sıvı parafin, gliserin, metil gluset-20, bütülen glikol dicaprilat/ dikaprat, sodyum akrilat/sodium akriloidimetil taurat kopolimer, gliseril akrilat/akrilik asit kopolimer, gliserin/ palmitoil tripeptid-5, bütülen glikol, PVM/MA kopolimer, gliseril stearat SE, PEG 100 stearat, hidrolize inci, setearil alkol, polisorbitat 60, hyalorinik asit, petrolatum, deniz suyu, *Laminaria japonica* (konbu) ekstresi, *Angelica keiskei* (ashitaba) yaprak/kök ekstresi, *Aloe ferox* (sarısabır) ekstresi, *Laminaria digitata* (deniz yosunu) ekstresi, propilen glikol, *Saccharomyces* lizatu ekstresi, *Oryza sativa* (pirinç) kallus kùltür ekstresi, *Zanthoxylum piperitum* (Japon biberi) ekstresi, metilparaben, parfüm, propilparaben, fenoksietanol, *Pulsatilla koreana* (kore köknarı) ekstresi, *Usnea barbata* (sakal likeni) ekstresi, disodyum EDTA ve ksantan gum.

c) N3 kodlu Anti-aging Kreminin İçeriği

Su, etilheksil metoksisinamat, bütülen glikol, benzofenon-3, etilheksil salisilat, siklopentasilokzan, C12-15 alkil benzoat, PEG-8, hidrojene poliizobuten, titanyum dioksit, setearil alkol, dimetikon, dilauril tiodipropianat, polymethylsilsesquioxane, hidroksietil üre, setil alkol, fenoksietanol, PEG-100 stearat, pentilen glikol, kaprilil glikol, silika, hidroksietil akrilat/sodyum akriloidimetil taurat kopolimer, trietanolamin, karbomer, setearil glukozid, skualan, disodyum EDTA, parfüm, etilen/propilen/stiren kopolimer, askorbil glukosid, kolesterol, ksantan gum, dimetilkonon, üre, polisorbitat 60, akrilatlar/ C10-30 akril akrilat çapraz polimerleri, trietoksikaprililsilan, magnezyum askorbil fosfat, tokoferil asetat, bütülen/etilen/stiren kopolimer, hidrolize ipek, *Saxifraga sarmentosa* (taşkıran çiçeği) ekstresi, *Morus nigra* (kara dut) kökü ekstresi, *Scutellaria baicalensis* (Çin takke çiçeği) kökü ekstresi, *Vitis vinifera* (üzüm) ekstresi, bütillenmiş hidroksitoluen, sodyum sülfıt, sodyum metabisülfıt, bütılparaben, denature alkol, etılparaben, etanolamin ve amonyum laktat.

d) N4 kodlu Anti-aging Kreminin İçeriği

Su, gliserin, petrolatum, etilheksil palmitat, kaprilik/kaprik trigliserid, bütülen glikol, setearil alkol, propilen glikol stearat, *Glycine soja* (soya fasulyesi) yağı, lauril laktat, trietanolamin, PEG 40 stearat, karbomer, dimetikon, *Simmondsia Chinensis* (jojoba) yağı, beyaz balmumu, imidazolidinil üre, metilparaben, hidroksietilsellüloz, kolet-24, trimetilsiloksisilikat, parfüm, skualan, skualen, retinil palmitat, propilen glikol, *Pyrus malus* (elma) ekstresi, *Vitis vinifera* (üzüm) ekstresi, sodyum askorbat, fosforik asit, PEG-7 gliseril kokoat, sodyum PCA, fenoksietanol, *Glycine soja* (soya fasulyesi) katı yağı, hidrojene lesitin, PPG-2 setearat-9, fosfolipidler, *Eucalyptus globulus* (okaliptus) ekstresi, hiyalorinik asit, *Geum Rivale* (karanfil kökü) ekstresi, α -tokoferol, DMDM hidantoin, *Lupinus albus* (acı bakla) ekstresi, arjinin, glisin, prolin, kuarternium-15, ksantan gum, *Helianthus Annus* (ayçiçeği) çekirdeği yağı, butilparaben, etilparaben, beta gluklan, *Vitis vinifera* (üzüm) çekirdeği yağı, izobütilparaben, propilparaben, *Thymus vulgaris* (kekik) ekstresi, glikolipid, sodyum dehidroasetat, *Oenothera biennis* (akşam sefası) yağı, potasyum sorbat ve fitosterol.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kremlerde Yapılan Fiziksel İncelemeler

3.2.1.1. Kremlerde pH Ölçümü

1'den 4'e kadar kodlanan kremler steriil ve temiz pomat kutularına hesaplı miktarda konulmuş ve pH'ları pH metre yardımıyla ölçülmüştür. Herbir kremin ölçümünden sonra pH metrenin elektrodu iyice yıkanıp temizlenmiştir. Yeniden kalibrasyon işlemi yapıp, diğer kremin ölçümüne geçilmiştir. Ölçümler, en az üç kez tekrarlanıp aritmetik ortalamaları alınmıştır.

3.2.1.2. Viskozite Ölçümü

Stabilite çalışması öncesi ve sonrası tüm kremlerin viskozitesi 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.

3.2.1.3. Emülsiyon Tiplerinin Belirlenmesi

Emülsiyon şeklinde hazırlanmış olduğu görülen kremlerin emülsiyon tipleri boya testi kullanılarak belirlendi. Önce; bir miktar krem alınarak lam üzerine yayıldı. Üzerine, bir damla metilen mavisi damlatıldı. Spatül yardımıyla iyice karıştırıldı. Sonra, optik mikroskop altında 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. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.2.1. 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.

3.2.2.2. Hücre Kültürüne Uygulanacak Anti-aging Kremler için Yapılan Önışlemler

Çalışmamızda kullanılan tüm anti-aging kremler 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 yapılp karıştırılmış ve vortekslenmiştir. Krem numunelerinin iyice çözünmesi için 20 dak. ultrasonik su banyosunda tutulmuştur.

3.2.2.3. Hücre Dizileri ve Kültür Aşaması

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi'nden (MAM) kriyo-well halinde alınan fare embriyonik 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 embriyonik 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 flasktaki tüm besiyeri steril pipet yardımıyla çekildi. Besiyeri çekilmiş flasklara 37 °C su banyosunda ısıtılan 1X'lik Tripsin-EDTA'dan 1-2 mL eklendi. Flasklara eklenen Tripsin-EDTA steril pipet yardımıyla çekildi. Tripsini çekilen flasklara yine aynı miktarda Tripsin-EDTA eklendi. Flasklar 5-7 dak. boyunca 37 °C'de karbondioksitli etüvde bekletildi. Flask 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. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücrelerle birlikte 0.5 mL sıvı steril pipet yardımıyla alınarak, önceden içlerine 4 mL besiyeri konmuş flakslara, hücrenin yoğunluk durumuna göre (2-4 flask) dağıtıldı.

3.2.2.4. Hücrelerin Deney için Hazırlanması

Hücreler, deney için flask içerisinde yeterli sayıya eriştiklerinde 1 mL tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Eklenen tripsin solüsyonu 1 dak. hücrelerin üzerinde gezdirildi ve flasklar 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 platelere uygun sayıda (5×10^5) 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 N1, N2, N3, N4 ve 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. N1, N2, N3 ve N4 gruplarına 100'er µL her bir anti-aging 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. 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 10^4 ile çarpılıp ölü ve canlı hücrelerin yüzde değerleri bulunmuştur.

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

3.2.4. 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 sitotoksitesisi 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.

3.3.5. Hücre Kültüründe Biyokimyasal Ölçümler

Tüm gruplardaki fare embriyonik 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.

3.3.5.1. Protein Ölçümü (Lowry Metodu)

Denevin Prensi:

Homojenizatlardaki protein miktarları Lowry ve ark. tarafından tarif edilen yöntemle ölçüldü (145). Alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşmaktadır. Bu kompleks fosfomolibdatfosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteus-Phenol Reaktifi)

redüklemekte ve koyu mavi bir renk oluşturmaktadır. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

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.

Deneyin Yapılışı:

Kapalı tüplere aşağıdaki maddeler, çizelgede belirtilen oranlarda konuldu.

Çizelge 3.1. Lowry yöntemine göre protein miktar tayini deneyinin prosedürü

	Kör tüpü	Numune tüpü	Standart
Numune (µL)	-	300	-
Distile su (µL)	300	-	-
Standart (µL)	-	-	300
C reaktifi (µL)	3000	3000	3000
Karıştırılarak 15 dak. beklendi.			
D reaktifi(µL)	300	300	300

Tüpler vortekslenerek 20-30 dak. oda ısısında inkübe edildi. Spektrofotometrede 750 nm'de numunenin ve standardın absorbansı köre karşı okundu.

Her bir örnek için protein miktarı, BSA standart çözeltileri ile hazırlanan standart eğrisine göre ve dilüsyon faktörüyle çarpılarak hesaplandı. %10'luk doku homojenatlarında ve 10.000 g süpernatant fraksiyonlarında protein miktarı mg olarak bulundu.

3.3.5.2. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini

Katalaz aktivitesi tayini Aebi tarafından tarif edilen yöntemle yapıldı (146). Yöntemin esası, H₂O₂ substratının katalaz ile enzimatik yıkılmasının 240 nm de izlenmesidir.



Kullanılan Reaktifler:

Potasyum Dihidrojen Fosfat Çözeltisi (A): 0,681 g KH₂PO₄ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Disodyum Hidrojen Fosfat Çözeltisi (B): 2,77 g Na₂HPO₄.12H₂O bidistile suda çözülerek 155 mL'ye tamamlandı.

Fosfat Tamponu (50 mM pH 7,0): A/B oranı 1/1,55 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı ve pH 7'ye ayarlandı.

Hidrojen Peroksid Çözeltisi (30 mM): 34 µl %30 luk H₂O₂ 10 mL'ye fosfat tamponu ile tamamlandı.

Deneyin Yapılışı: Kuvarz spektrofotometre kuvetlerine 10 µl 10.000 g süpernatant fraksiyonu ve üzerlerine 1990 µl fosfat tamponu ilave edildi. Örnek kuvetine 1 mL 30 mM H₂O₂ ilave edildi ve hemen karıştırılarak örneğin absorbansındaki azalma köre karşı 1 dak. boyunca 240 nm'de izlendi. Spesifik aktivitesi ünite/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.3.5.3. Süperoksid Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini

Deneyin Prensibi: 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 dayanmaktadır (147).

Kullanılan Reaktifler:

Sodyum Hidroksid Çözeltisi (0,1 N): 0,4 g NaOH bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.

Stok Ksantin Çözeltisi (3 mM): 4,6 mg ksantin tartılıp, 1 mL 0,1 N NaOH çözeltisinde hafif ısı uygulaması ile çözülerek bidistile su ile 10 mL’ye tamamlandı. Çözelti, literatürde belirtildiği gibi +4 °C’de bir hafta dayanıklı kaldı.

Ksantin Çözeltisi (0,3 mM): Stok ksantin çözeltisinden 1 mL alınarak bidistile su ile 10 mL’ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

Etilendiamintetraasetik Asid Çözeltisi (0,6 mM): 22,32 mg Na₂EDTA. 2H₂O bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.

Sodyum Karbonat Çözeltisi (400 mM): 4,24 g Na₂CO₃ bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.

BSA Çözeltisi (1 g/L): 10 mg BSA bidistile suda çözülerek 10 mL’ye tamamlandı.

Nitroblue Tetrazolium Klorür (NBT) Çözeltisi (0,15 mM): 1,226 mg NBT bidistile suda çözülerek 10 mL ye tamamlandı. Her deney günü taze olarak hazırlandı.

SOD Çalışma Reaktifi: 10 mL 0,3 mM ksantin, 5 mL 0,6 mM Na₂EDTA, 3 mL 400 mM Na₂CO₃, 1,5 mL 1 g/L BSA, 5 mL 0,15 mM NBT karıştırılarak her deney günü taze olarak hazırlandı.

Amonyum Sülfat Çözeltisi (2 M): 26,428 g (NH₄)₂SO₄ bidistile suda çözülerek 100 mL’ye tamamlandı.

Ksantin Oksidaz Çözeltisi (167 U/L): 2 mg ksantin oksidaz soğutulmuş (NH₄)₂SO₄ çözeltisinde çözülerek 1 mL’ye tamamlandı.

Bakır Klorür Çözeltisi (0,8 mM): 13,64 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ bidistile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlandı.

Denevin Yapılışı: 2,85 ml SOD reaktifi örnek ve kör tüpüne aktarıldı. Örnek tüpüne 100 µl süpernatant ilave edildi ve her iki tüpe de 50 µl ksantin oksidaz eklendi. Tüpler 25 °C'de 20 dak. inkübe edildikten sonra tüplere 100 µl CuCl_2 çözeltisi eklendi. En son aşama olarak da kör tüpüne 100 µl süpernatant eklenerek karıştırıldı. Kör ve örnek tüplerinin 560 nm'de absorbansları ayrı ayrı ölçülüp SOD aktivitesi tespit edildi. Spesifik aktivite U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.3.5.4. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Lipit peroksidasyon ürünlerinden en stabili olan MDA'nın tiobarbütirik asit ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe kırmızı rengin absorbansı spektrofotometrik olarak değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır (148).

Kullanılan Reaktifler:

Stok tetrametoksipropan çözeltisi: 0,92 gr tetrametoksipropan 1 mL'de çözüldü.

Günlük tetrametoksipropan çözeltisi: 10 mL'lik stok çözelti 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. Çalışma sırasında günlük çözelti tekrar 1/10 oranında seyreltildi.

SDS çözeltisi: 8,1 gr SDS tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlandı ve çözüldü.

Asetik Asit çözeltisi: 20 mL asetik asit distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve pH'sı 3,5'e ayarlandı.

TBA çözeltisi: 0,8 gr TBA tartılıp 100 mL'ye distile su ile tamamlandı ve ısıtılarak çözüldü.

n-bütanol-piridin çözeltisi (15:1): Stok piridin 1 mL'si 15 mL n-bütanol ile karıştırıldı.

Denevin Yapılısı:

Çizelge 3.2’de belirtilen şekilde standart, kör ve örnek tüpleri hazırlandı.

Çizelge 3.2. MDA miktar tayini deneyinin prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Standart (1/10 dilüe) (µL)	-	50	-
Örnek (µL)	-	-	50
SDS çöz. (µL)	100	100	100
Asetik Asit çöz. (µL)	750	750	750
TBA çöz. (µL)	750	750	750
Distile su (µL)	400	350	350

Tüpler 95 °C’de 30 dak. süre ile inkübe edildi. Musluk suyunda soğutuldu. 500 µL distile su eklendi. 2,5 mL n-bütanol-piridin karışımı eklenip tüpün kapağı kapatılarak karışımlar beyazlaşmıca kadar vortekslendi. 4000 rpm’de 15 dak. santrifüjlendi. Süpernatant fazdan 1 mL alınıp 532 nm’de köre karşı spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.2.6. İstatistiksel Yöntem

Analizler SPSS v.16.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır (149). Tüm 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 One Way ANOVA ve alt grup karşılaştırmalarında post-hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. pH Ölçümleri

Anti-aging kremlerinin pH'ları Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi ölçüldü. Piyasadan temin edilen anti-aging kremlerin pH değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Piyasadan temin edilen kremlerinin pH değerleri.

	N1	N2	N3	N4
pH	6,02±0,21	6,36±0,15	5,89±0,12	5,94±0,11

4.2. Viskozite Ölçümleri

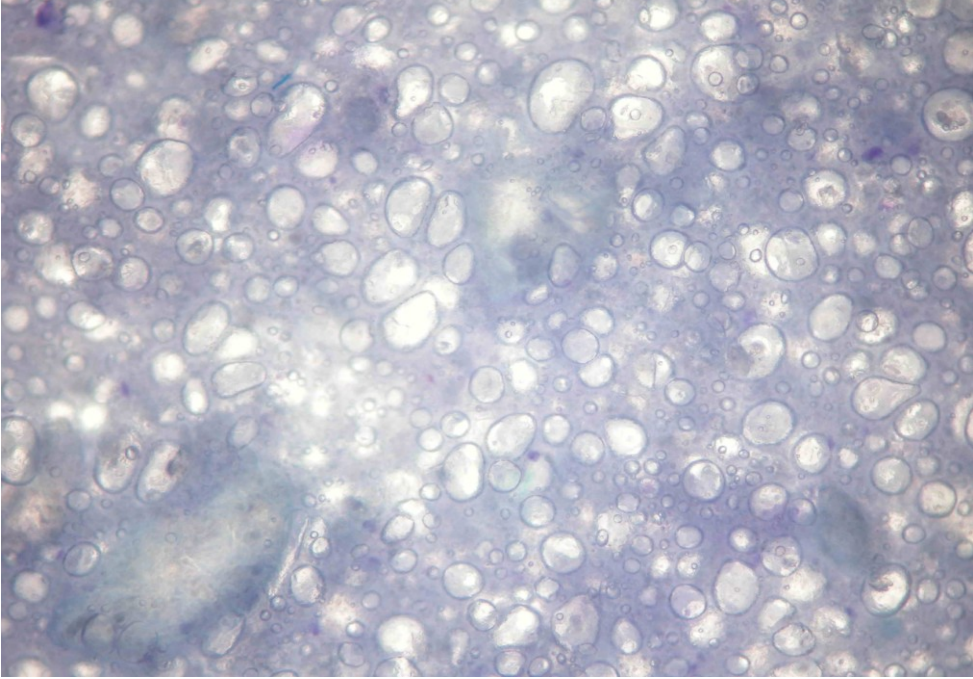
Anti-aging kremlerinin viskoziteleri Bölüm 3.2.1.2'te anlatıldığı gibi ölçüldü. Her bir formülasyon için ölçümler 5 kez tekrarlandı. Aritmetik ortalama alındı. Piyasadan temin edilen anti-aging kremlerin ortalama viskozite değerleri ortalama±standart sapma olarak Çizelge 4.2'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Piyasadan temin edilen kremlerinin viskozite değerleri (cP).

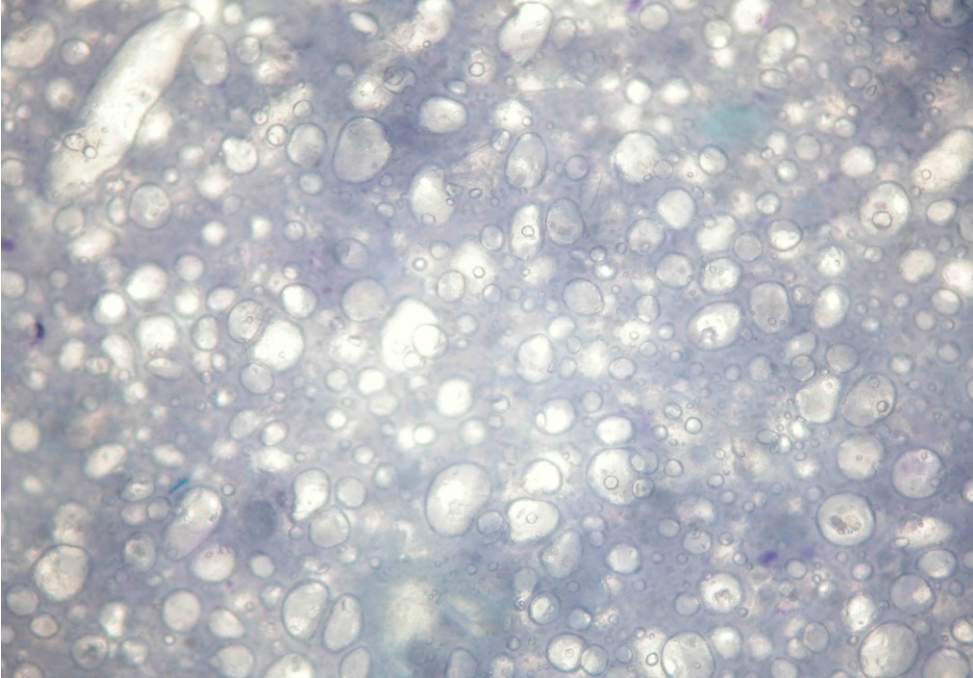
	N1	N2	N3	N4
Viskozite (cP)	22,64±1,24	23,08±1,35	15,8±1,14	18,06±1,17

4.3. Emülsiyon Tiplerinin Belirlenmesi

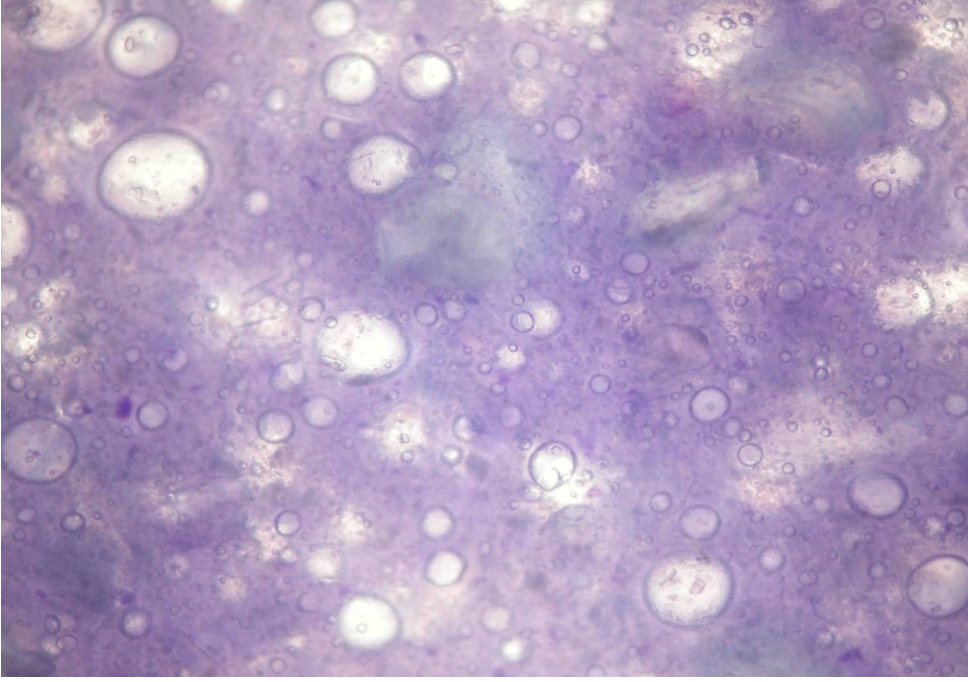
Piyasadan temin edilen anti-aging kremler, metilen mavisi ile boyandığında sürekli fazlarının mavi renkle boyandığını tespit edildi. Çalışmada kullanılan kremlerin dış fazlarının metilen mavisile boyanması, emülsiyon tiplerinin y/s tipi olduğunu göstermektedir. Çalışmada kullanılan kremlerin metilen mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu altındaki görüntüleri Şekil 4.1-4.4'de gösterilmiştir.



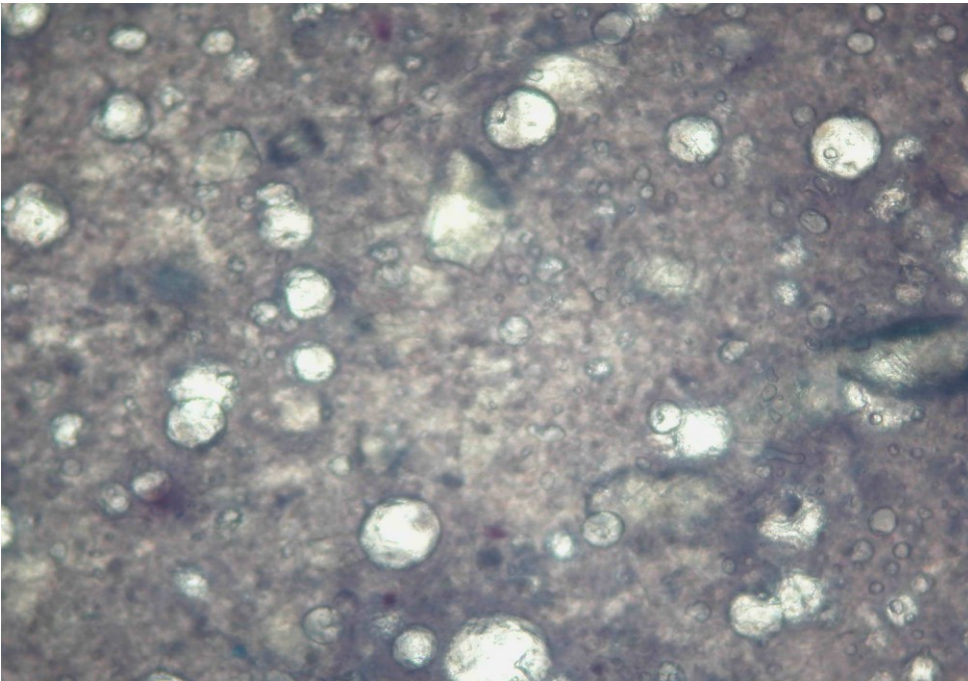
Şekil 4.1. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N1 kodlu antiaging kremimine ait fotogram



Şekil 4.2. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N2 kodlu antiaging kremimine ait fotogram



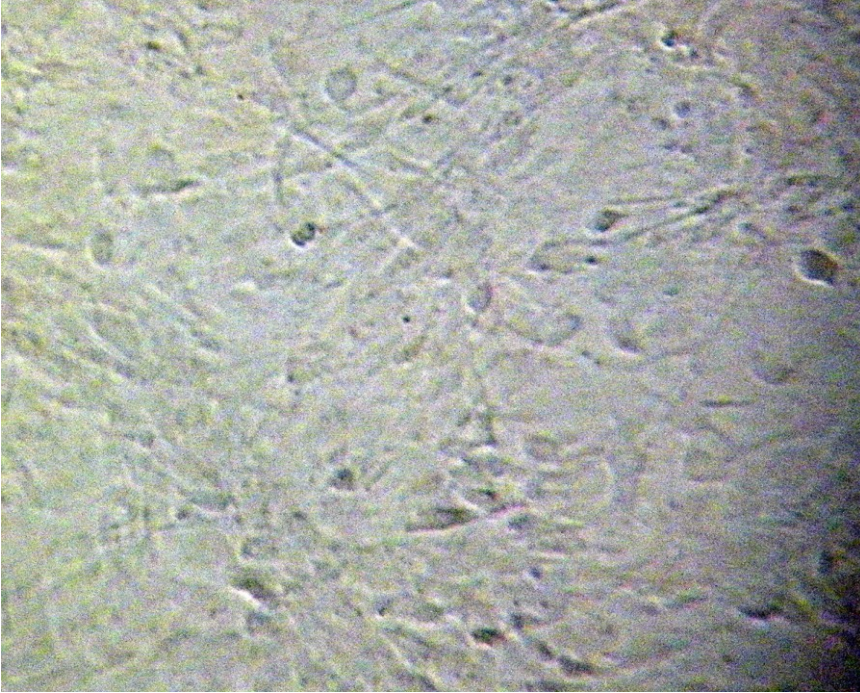
Şekil 4.3. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N3 kodlu antiaging kremimine ait fotogram



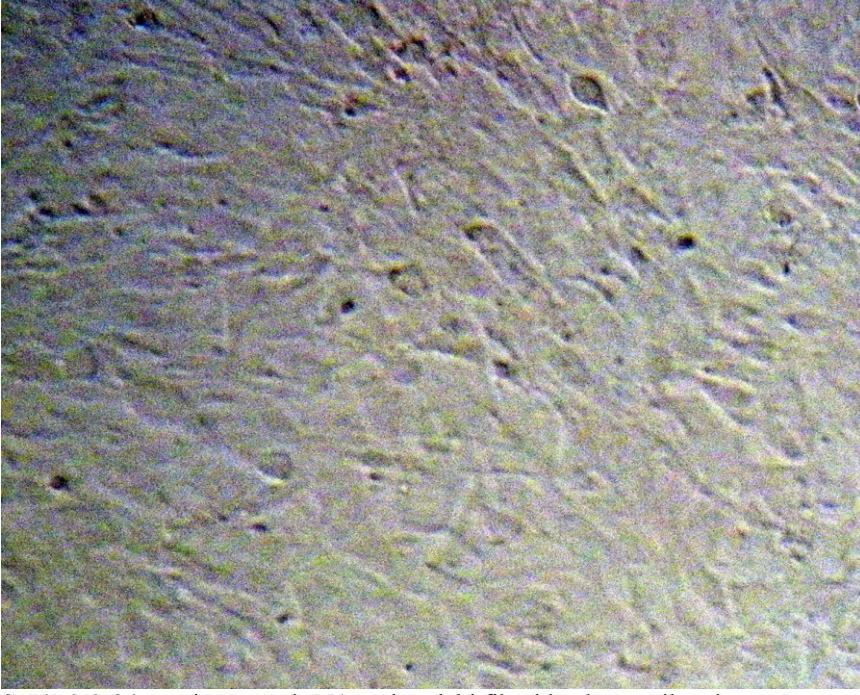
Şekil 4.4. Işık mikroskobu altında metilen mavisi ile boyanmış N4 kodlu antiaging kremimine ait fotogram

4.4. Fibroblast Hücresinde Sağkalım Oranları

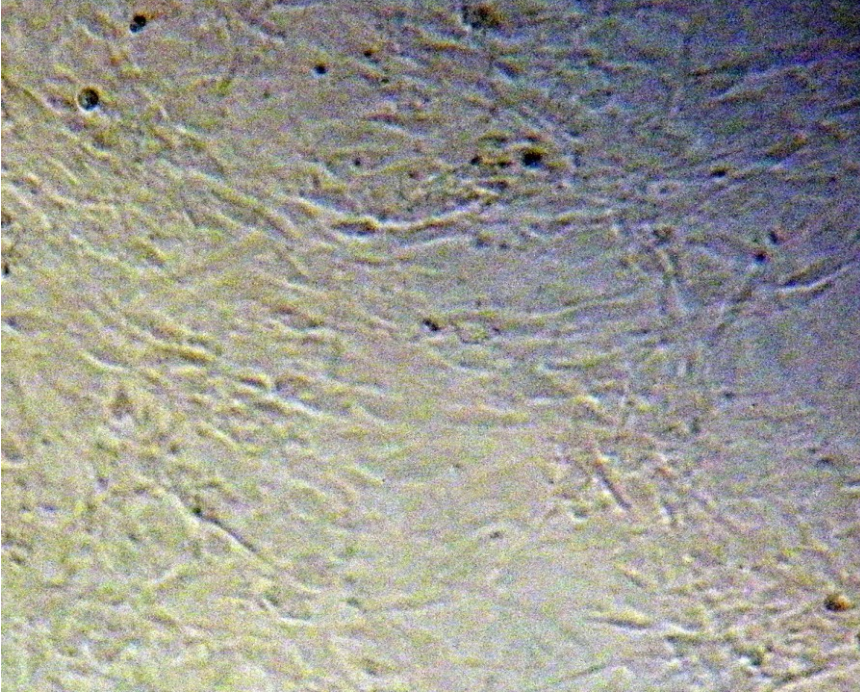
Yaptığımız çalışmada fare embriyonik fibroblast hücreleri, kültür ortamında 24 ve 48 saat boyunca 4 farklı anti-aging kremle inkübasyona bırakılmışlardır. 24. ve 48. saatlerin sonunda kontrol grubu, N1, N2, N3 ve N4 gruplarındaki fibroblast hücrelerinin mikroskopik görüntüleri Şekil 4.5-4.14'de verilmiştir.



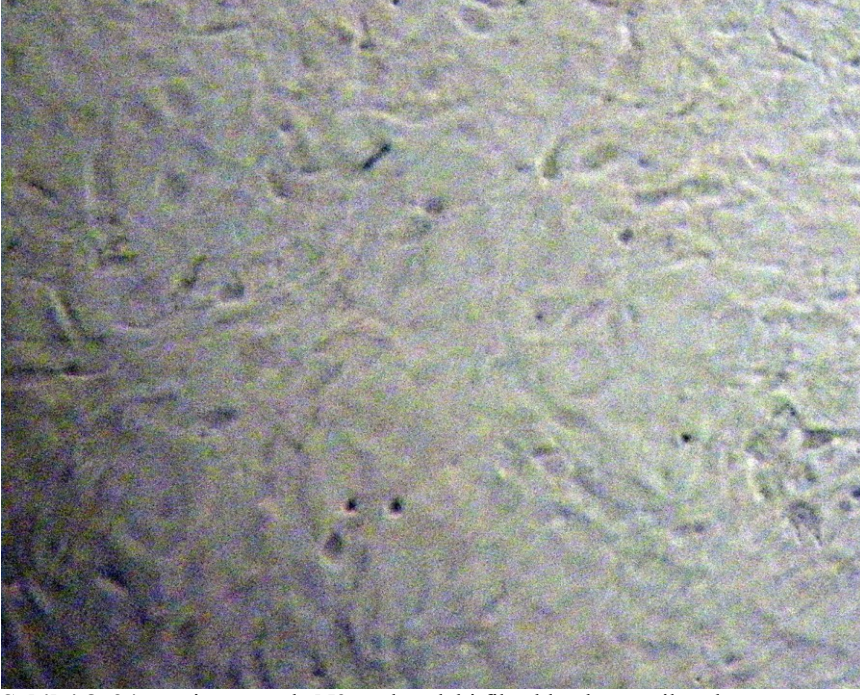
Şekil 4.5. 24. saatin sonunda kontrol grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



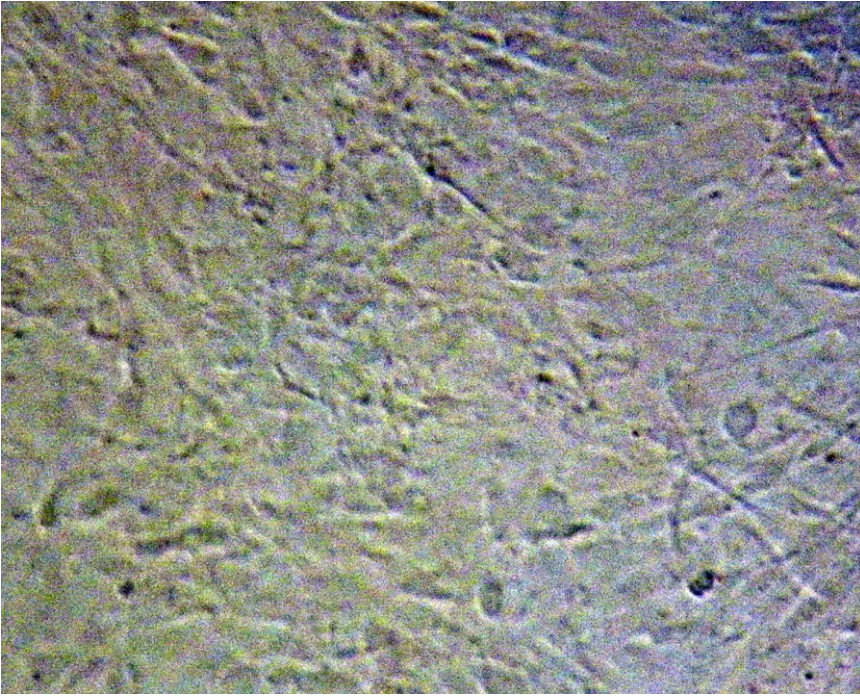
Şekil 4.6. 24. saatin sonunda N1 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



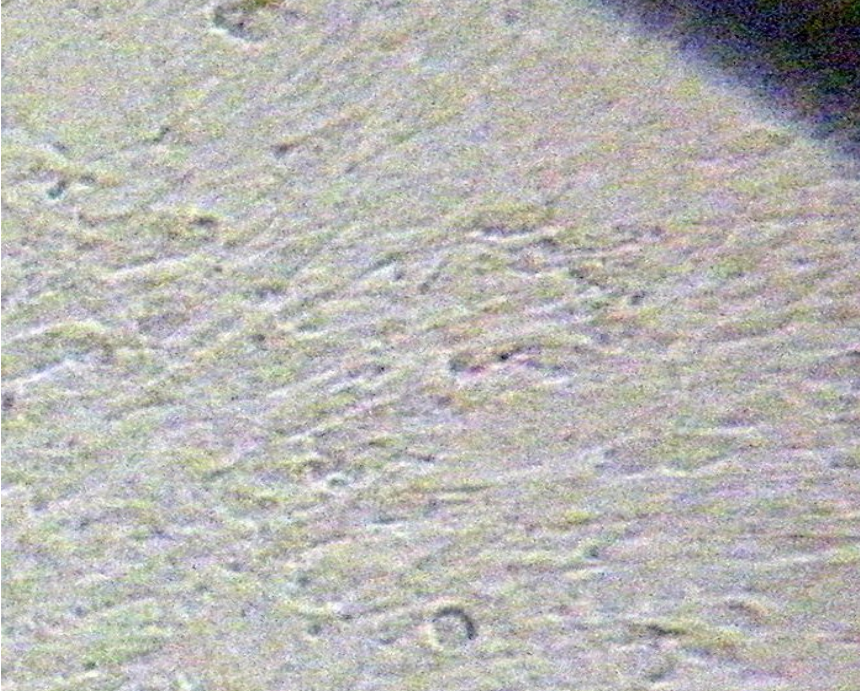
Şekil 4.7. 24. saatin sonunda N2 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



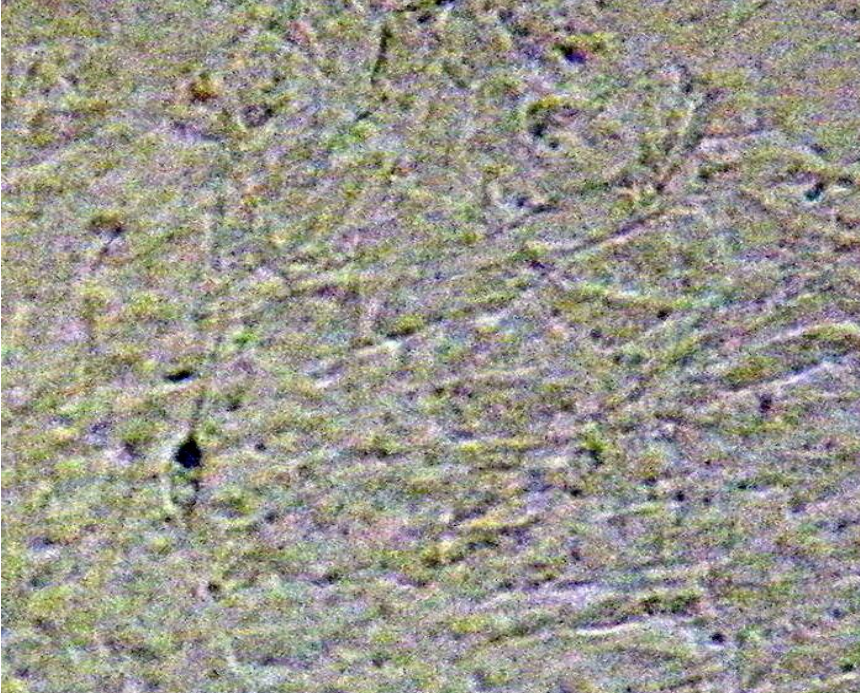
Şekil 4.8. 24. saatin sonunda N3 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



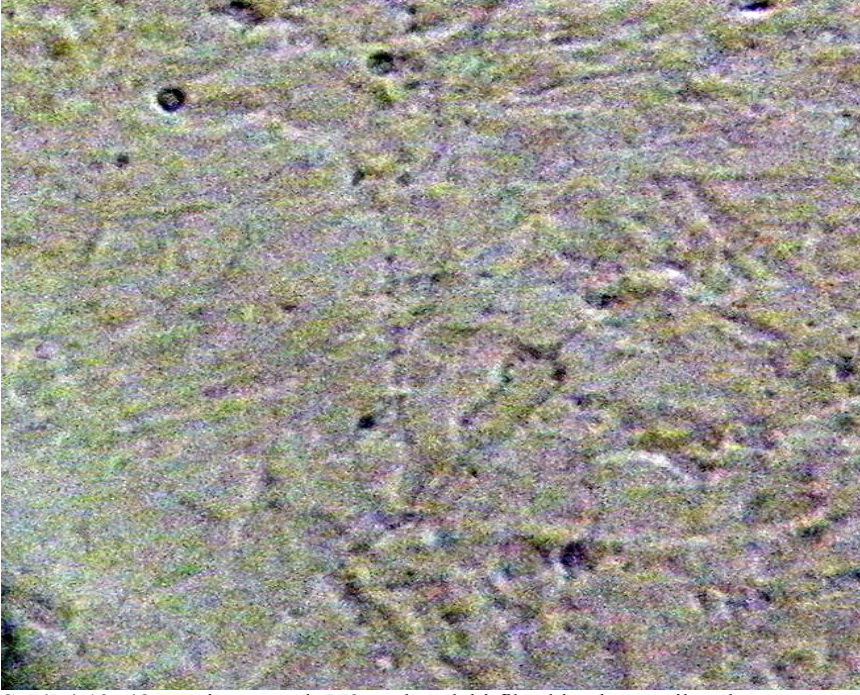
Şekil 4.9. 24. saatin sonunda N4 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



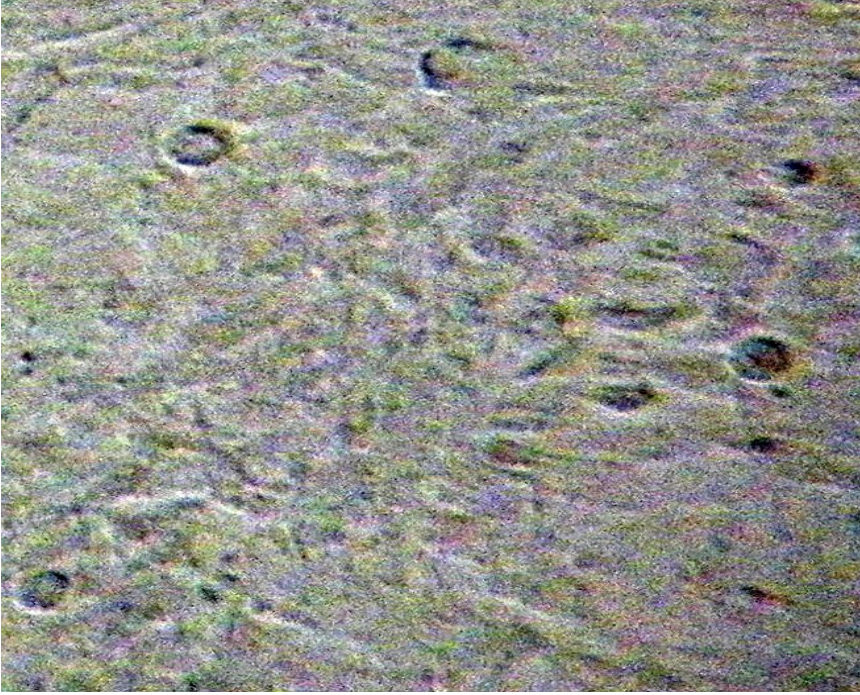
Şekil 4.10. 48. saatin sonunda kontrol grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



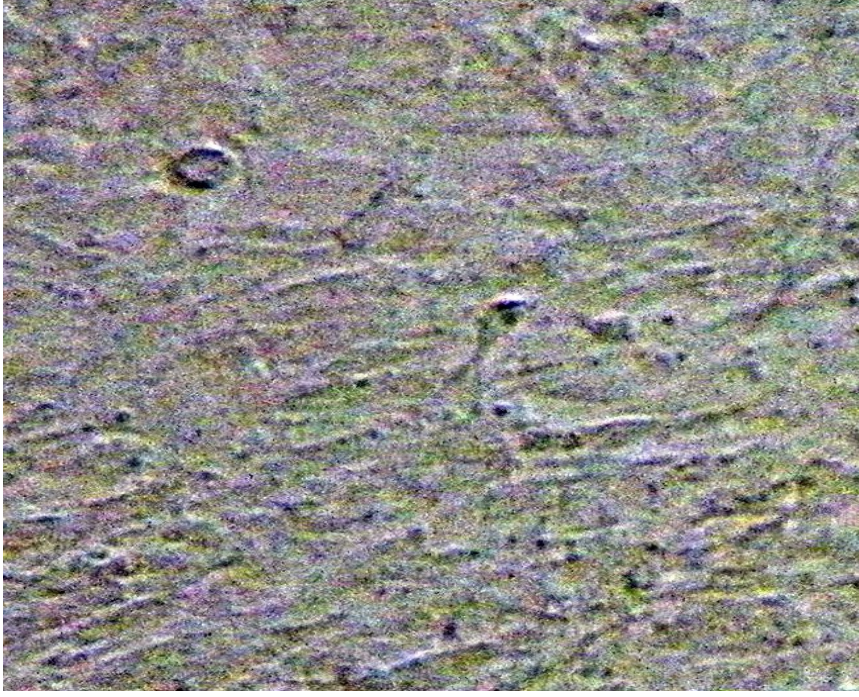
Şekil 4.11. 48. saatin sonunda N1 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



Şekil 4.12. 48. saatin sonunda N2 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü

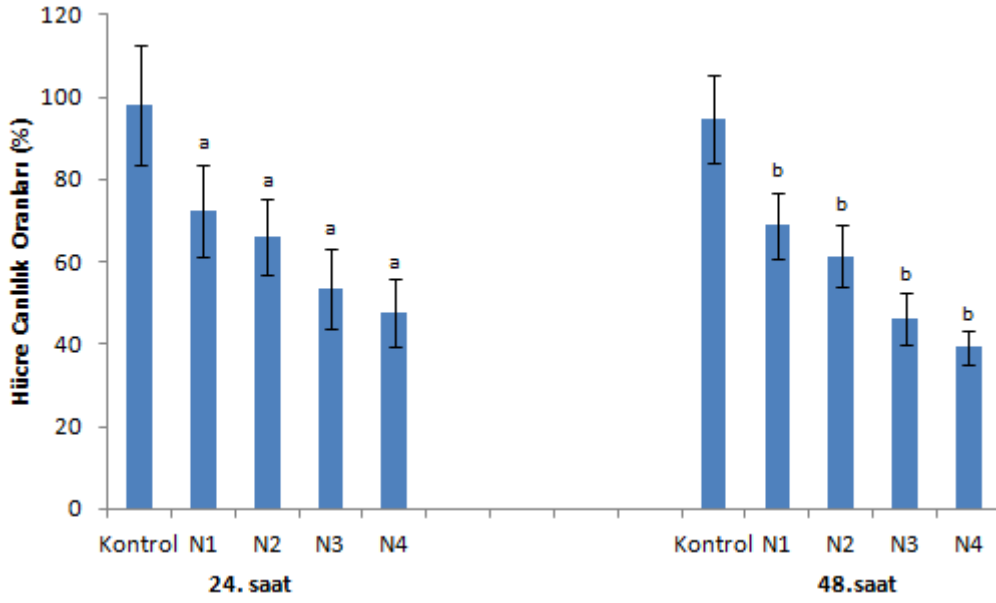


Şekil 4.13. 48. saatin sonunda N3 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü



Şekil 4.14. 48. saatin sonunda N4 grubundaki fibroblastların mikroskop görüntüsü

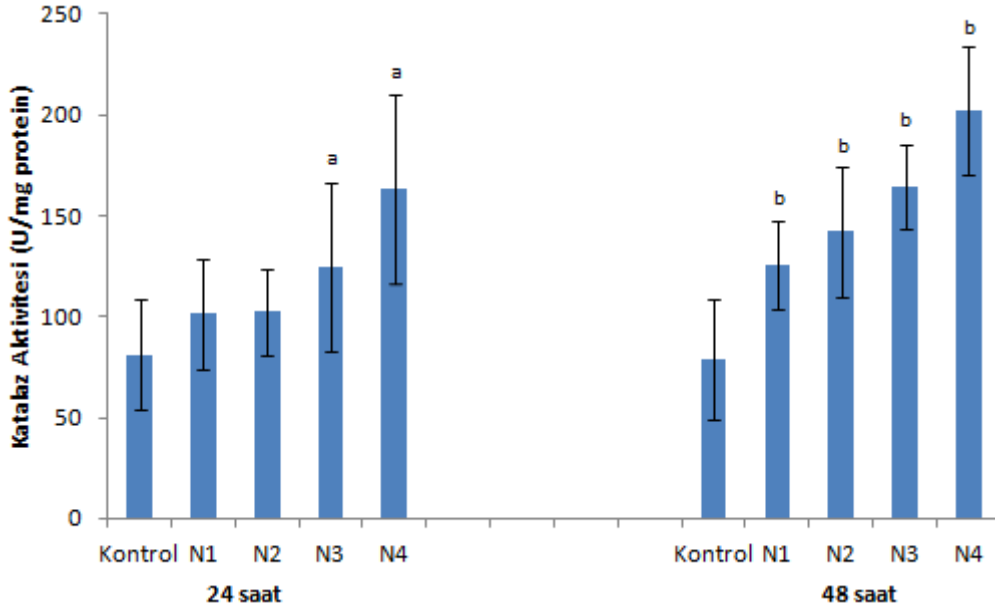
24. saatin sonunda kontrol grubunda, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde hücre canlılık oranları sırasıyla % 98,11±14,49, % 72,46±11,24, % 66,09±9,45, % 53,45±9,67 ve % 47,67±8,05 olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde canlılık oranları kontrol, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda sırasıyla % 94,53±10,71, % 68,76±8,05, % 61,29±7,54, % 46,16±6,44 ve % 39,34±4,19 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 N3, N4, N2 ve N1 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinin olduğu tespit edilmiştir. 48. saatin sonunda ise hücre ölümünün en fazla olduğu grupların sırasıyla N3, N4, N1 ve N2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinin olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerle 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilen fare embriyonik fibroblast hücrelerinde sağkalım (canlılık) oranları Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.15. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki canlılık oranları. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. (^a 24. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük, ^b 48. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulunmuştur).

4.5. Fibroblast Hücrelerinde Katalaz Aktiviteleri

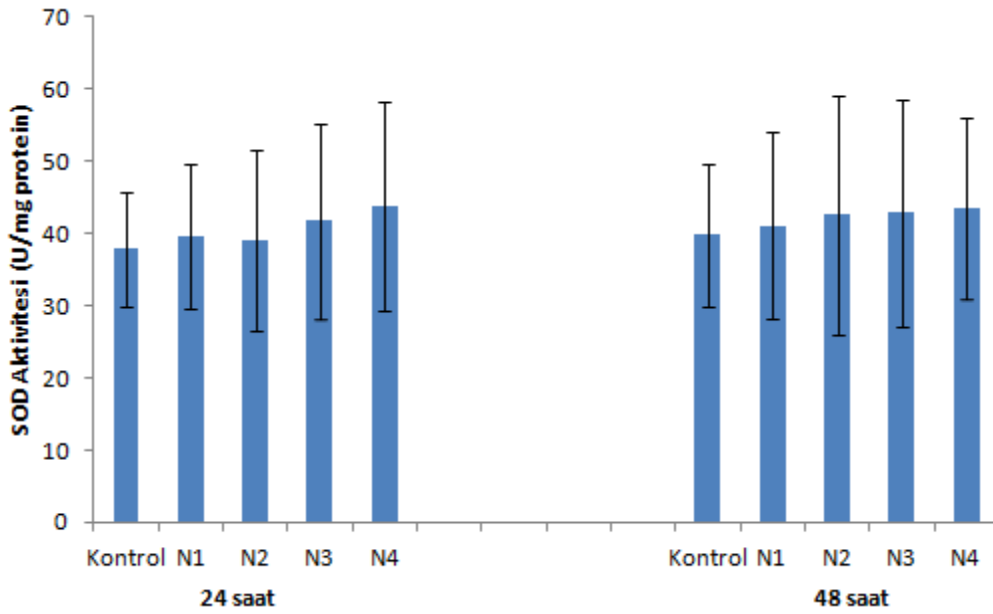
24. saatin sonunda kontrol grubunda, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz aktiviteleri sırasıyla 81,23±27,44 U/mg protein, 101,65±27,16 U/mg protein, 102,35±21,13 U/mg protein, 124,3±41,52 U/mg protein ve 163,71±46,73 U/mg protein olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde katalaz aktiviteleri kontrol, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda sırasıyla 78,82±30,12 U/mg protein, 125,74±21,98 U/mg protein, 142,03±32,54 U/mg protein, 164,25±20,74 U/mg protein ve 202,16±31,72 U/mg protein olarak bulunmuştur. 24. saatin sonunda N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde, 48. saatin sonunda ise N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz aktiviteleri kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0,05$). 24. saatin sonunda N1 ve N2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz aktivitesi kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmasına rağmen bu artış istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p > 0,05$). Kontrol grubu ile N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerle 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilen fare embriyonik fibroblast hücrelerinde katalaz aktiviteleri Şekil 4.16'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki katalaz aktiviteleri. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. (^a 24. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek, ^b 48. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur).

4.6. Fibroblast Hücrelerinde SOD Aktiviteleri

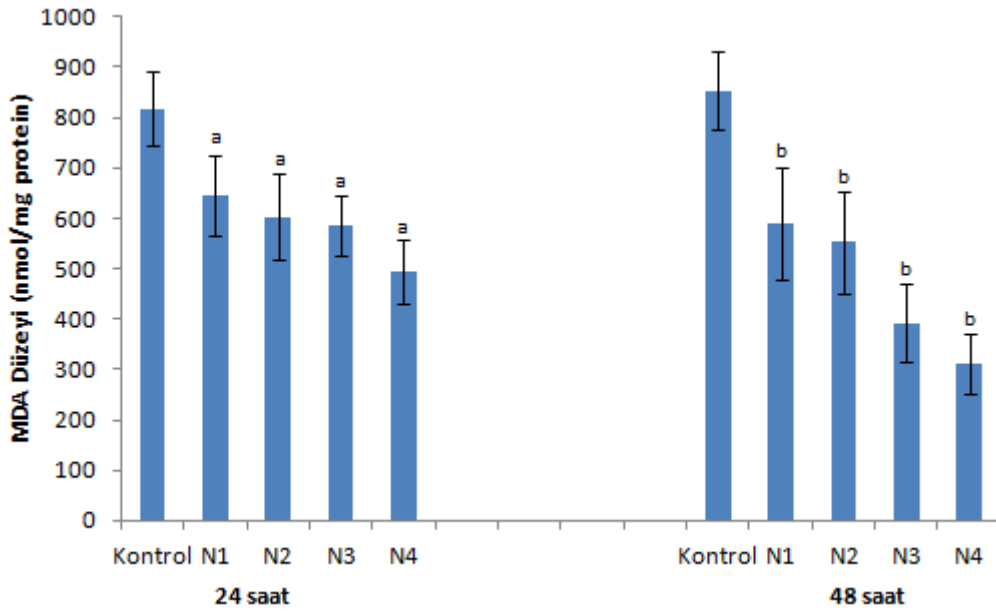
24. saatin sonunda kontrol grubunda, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde SOD aktiviteleri sırasıyla $37,82 \pm 7,83$ U/mg protein, $39,71 \pm 10,03$ U/mg protein, $39,13 \pm 12,51$ U/mg protein, $41,72 \pm 13,5$ U/mg protein ve $43,74 \pm 14,43$ U/mg protein olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde SOD aktiviteleri kontrol, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda sırasıyla $39,81 \pm 9,82$ U/mg protein, $41,13 \pm 13,04$ U/mg protein, $42,57 \pm 16,51$ U/mg protein, $42,92 \pm 15,74$ U/mg protein ve $43,51 \pm 12,53$ 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 ($p > 0,05$). Kontrol grubu ile N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerle 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilen fare embriyonik fibroblast hücrelerinde SOD aktiviteleri Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



Şekil 4.17. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki SOD aktiviteleri. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

4.7. Fibroblast Hücrelerinde MDA Düzeyleri

24. saatin sonunda kontrol grubunda, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde MDA düzeyleri sırasıyla $817,25 \pm 73,42$ nmol/mg protein, $645,91 \pm 80,14$ nmol/mg protein, $603,14 \pm 84,53$ nmol/mg protein, $584,7 \pm 60,03$ nmol/mg protein ve $493,82 \pm 63,52$ nmol/mg protein olarak bulunmuştur. 48. saatin sonunda ise fibroblast hücrelerinde MDA düzeyleri kontrol, N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda sırasıyla $853,4 \pm 77,9$ U/mg protein, $590,84 \pm 111,83$ U/mg protein, $551,96 \pm 102,68$ U/mg protein, $392,08 \pm 77,06$ U/mg protein ve $311,93 \pm 59,71$ 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 N4, sonra sırasıyla N3, N2 ve N1 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda görülmüştür. Kontrol grubu ile N1, N2, N3 ve N4 kodlu kremlerle 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilen fare embriyonik fibroblast hücrelerinde MDA düzeyleri Şekil 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.18. 24. ve 48. saatin sonunda fare embriyonik fibroblast hücrelerindeki MDA düzeyleri. Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. (^a 24. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük, ^b 48. saatin sonunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulunmuştur).

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, öncelikle, hayvan deneylerine alternatif bir yöntem olarak fibroblast hücre kültürünün kullanılması açısından önem taşımaktadır (141,142). 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 (141,142,150). 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 (151,152). 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 (153). Deride hücresel 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 lipitlerini, proteinlerini etkileyerek keratinizasyon bozukluklarına neden olmaktadır (153-155).

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 glutasyon peroksidaz-redüktaz, membran lipoproteinlerini ışığa bağlı hasardan ve yaşlanmadan korur (156,157).

Piyasada topikal olarak uygulanan anti-aging preparatlarda anti-oksidan özelliğindeki vitaminlerin kullanılması oldukça yaygındır (67). 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 (67,151,152).

Çalışmamızda kullandığımız gündüz kremi olan N3 kodlu anti-aging kremde C vitamini türevi olarak askorbil fosfat ve askorbil glukosid ile E vitamini türevi olan tokoferol asetat bulunmaktadır. Gece kremi özelliğinde olan N4 kodlu krem ise α -tokoferol ve C vitamini türevi olan sodyum askorbat bulunmakla birlikte A vitaminin türevi olan retinil palmitat içerir. Pinnell ve arkadaşları C vitaminin, kollajen sentezinin transkripsiyonel regülasyonu için gerekli olduğunu, dermal kollajen parçalanmasını arttıran matriks metalloproteinaz üretimini azalttığını, elastin biyosentezini inhibe ettiğini, bundan dolayı da yaşlanmış deride görülen artmış elastin depolanmasını azaltmada faydalı olabileceğini söylemişlerdir (158). Ayrıca vitamin C'nin, deride pigment sentezini tirozinazı inhibe ederek azalttığını ve sfingolipid üretimini uyararak epidermal bariyer fonksiyonunu iyileştirdiğini bildirmişlerdir (158). Boelsma ve arkadaşları, tek başına askorbik asidin veya α -tokoferolun deride meydana gelen eritemi azaltmazken, ikisinin kombine kullanımının eritemi önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir (57). Chiu ve arkadaşları askorbik asidin α -tokoferolun oksidasyona uğramış formlarının yenilenmesine yardım ettiğini, lipid membran ve hücrel sistemlerde C vitamininin, E vitamini oksidasyondan koruduğunu öne sürmüşlerdir (159). E vitamini okside olduğunda tokoferoksil radikale dönüşmekte ancak bu radikal C vitamini ile etkileşerek yeniden antioksidan özellik kazanmaktadır. Bu reaksiyon sonucunda C vitamini askorbil radikale dönüşmekte ancak bu radikal glutasyon ile etkileşerek yeniden antioksidan özellik kazanmaktadır. Meydana gelen okside glutasyon

ise glutasyon redüktaz enzimi sayesinde yeniden ilk durumuna döner. Bu siklusun tamamlanabilmesi için E ve C vitaminlerinin birlikteliği kremin stabilitesi için oldukça önem taşımaktadır (159). Bu nedenle, bu çalışmada gündüz kremi özelliğinde olan N3'ün C ve E vitaminleri kombine olarak kullanması özellikle UV ışınlarından kaynaklanan oksidatif hasarın önlenmesinde önemli rol oynadığı kanaatine varılmıştır.

Günümüz kremlerinde sıklıkla kullanılan E vitamini türevleri α - tokoferol, tokoferol asetat ve tokoferol linoleattır (67,152). Bunlarda özellikle tokoferol asetat ve tokoferol linoleat doğal nemlendirici özelliği nedeniyle saç ve cilt bakım ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (67,152). Thiele ve arkadaşları, E vitamininin epidermisteki major antioksidan olduğu, azalmasının çevresel oksidatif hasar için erken ve hassas bir belirleyici olduğu gösterilmiştir (160). Yapılan çalışmalarda tokoferol asetatın deriden çok iyi absorblanabildiği ancak biyolojik aktif form olan α -tokoferole yeteri kadar dönüşmediği gösterilmiştir (160). Gallardo ve arkadaşları, vitamin E'nin % 2'lik lipojel ve hidrojel formülasyonlarının yaşlanma tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (161). Hidrojel formülasyonunun fotohasarlı deride antioksidan olarak, lipojel formülasyonunun ise fotohasarlı ve ayrıca kronolojik olarak yaşlanmış deride antioksidan özelliğiyle kullanılabileceğini söylemişlerdir (161). Yaptığımız çalışmada E vitamini, N3 kreminin içerisinde tokoferol asetat, N4 kreminin içerisinde ise aktif formu olan α -tokoferol halinde bulunmaktadır. Tokoferol asetatın güçlü nemlendirici özelliğinden dolayı gündüz kreminde, α -tokoferolün ise güçlü antioksidan özelliğinden dolayı gece 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 N4 kodlu krem uygulanan grup olması, topikal olarak α -tokoferolün, tokoferol asetatından daha etkin olduğunu göstermektedir.

Vitamin E'nin tüm insan derisinde herhangi bir fotokoruma sağlayabilmesi için vitamin C, selenyum veya tiyoller gibi antioksidanlarla kombine olarak kullanılması gerekir (67). Bu kombinasyonun sebebi bu antioksidanların tokoferolün degradasyonunu engellemesidir (67). Yaptığımız çalışmada hem N3 hem de N4 kodlu kremlerde E vitamininin yanında C vitamini de kullanılmaktadır. Fibroblast hücre kültüründe katalaz aktivitesinin her iki süre sonunda da en fazla N4 daha sonra da N3 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda yüksek bulunması, C vitamininin, α -tokoferolün oksidasyona

uğramış formlarının yenilenmesine ve hücrel sistemlerde ve lipid membranlarda okside olmasını engellemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

N4 kodlu krem C ve E vitaminlerinin kombine kullanımı gibi güçlü antioksidan özellik taşımasının yanı sıra A vitaminini de içermektedir (67). A vitamini ve türevleri genellikle güneş ışığı altında degrade 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 (67,152). Weinstein ve arkadaşları, retinoik asitin, deride UV teması sonrası hasar oluşturan metalloproteinazlar üzerinde inhibitör etki göstererek kollajen yıkımını azalttığını gözlemlemişlerdir (162). 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 (163). Ayrıca kollajen üretiminin artması, kırışıklık ve derin çizgilerin giderilmesinde ve UV'den kaynaklanan pigmentasyonu inhibe etmektedir (163). N4 kodlu kremin 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 (67,163).

Yaptığımız çalışmada, antioksidan vitaminler olan A, C ve E vitaminleri N4 kreminde kombine halde bulunmaktadır. Çalışmamızda her iki süre sonunda da fare embriyonik fibroblast hücre homojenizatlarında MDA düzeyinin en düşük, katalaz aktivitesinin ise en yüksek olduğu grubun bu grup olması A vitamininin önemli bir topikal antioksidan olduğunun göstergesidir. Çalışmamızda yer alan N1 ve N2 kodlu kremlerde hiçbir antioksidan vitamin yer almamaktadır. Hem 24 saat hem de 48 saat süre ile N1 ve N2 kodlu kremlerle inkübe edilen fibroblast kültürlerinde MDA düzeyinin azalması ve katalaz seviyesinin artması preparatlarda kullanılan diğer antioksidan özellikteki

maddelerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ancak özellikle katalaz aktivitesinin N1 ve N2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerindeki katalaz aktivitesindeki artışın, N3 ve N4 kodlu kremlerin uygulandığı gruplar kadar yüksek olmaması bu preparatlarda antioksidan vitaminlerin bulunmamasından dolayı olabileceğini sanmaktayız. N1 ve N2 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda katalaz aktivitesinin diğer gruplar kadar artmamasına rağmen MDA düzeylerindeki anlamlı azalmanın sebebinin katalaz enziminin fibroblastlarda meydana gelen hidrojen peroksit radikallerinin temizlenmesi sırasında tüketilmesinden ve ortamda antioksidan vitamin olmadığından dolayı da tekrar yükselemediğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

N4 kodlu kremin uygulandığı hücrelerde katalaz aktivitesinin N3 kodlu kremin uygulandığı gruba kıyasla yüksek, MDA düzeyinin ise düşük olmasının sebebi, N4'ün bir gece kremi olmasından dolayı içerisindeki antioksidan vitamin konsantrasyonunun gündüz kremi olan N3'e nazaran daha yoğun olabileceğinden kaynaklanıyor olabilir (76,152). Ancak kremlerin ambalaj bilgilerinde içerdikleri biyoaktif maddelerin yüzdeleri yazmadığından dolayı bu saptamayı sadece literatür bilgimize dayanarak söylemekteyiz. Gece kremi özelliğinde olan N2 ile yine aynı firmaya ait olan ancak gündüz kremi niteliğindeki N1 kreminin uygulandıkları hücrelerdeki katalaz aktivitesindeki artış ve MDA düzeyindeki azalış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, kendi aralarında anlamlı bir fark göstermemesinin sebebinin yapılarında antioksidan vitamin olmamasından dolayı olduğunu sanmaktayız. 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 (152,155).

Anti-aging preparatların içeriklerindeki bir diğer önemli etken madde grubu ise peptid ve proteinlerdir. Aslında saç ve cilt bakım ürünlerinde proteinler çok uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (151,164). Kozmesötiklerde kullanılan proteinler genellikle hayvansal veya bitkisel olmakla birlikte bu protein molekülleri saf ya da hidrolize olarak kullanılmaktadır. Li ve arkadaşları, keratinosit ve fibroblast hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmada, proteinlerin canlı epidermis ve dermise ulaşmaları durumunda fibroblastları yenilediklerini, epidermis hücrelerinde protein sentezini arttırdıklarını ve bu sayede deri yaşlılık belirtilerini azalttığını, deri elastikiyetini ve

sıklığını arttırdığını tespit etmişlerdir (164). Ancak in-vitro çalışmalarda son derece olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen in vivo şartlarda proteinlerin deriden emilip deri esnekliğini ve sıklığını arttırdığını gösteren yeterli çalışma bulunmamaktadır (164). Kozmesötiklerde kullanılan protein ve yüksek molekül ağırlıklı hidrolizatların cilt üzerinde film oluşturma özelliklerinden yararlanılmaktadır. Proteinler deri yüzeyinde ölü epidermis tabakasının keratiniyle etkileşerek derinin nem içeriğini arttırmakta, derinin esnekliğinde artışa neden olarak deriyi korumakta ve mikrogörüntü daha düzgün duruma gelmektedir (151,164). Kozmesötiklerde sıklıkla kullanılan proteinler arasında yer alan badem, fibronektin, kollajen, elastin, retikülin, süt proteini, yulaf proteini, ipek proteini, soya proteini, buğday proteini ve maya proteini hidrolizatlar, deri irritasyonunu engelleyici ve nemlendirici olarak, çözünür kollajen desamido kollajen, albumin ve sodyum kazeinat nemlendirici ve koruyucu olarak, jelatin ise viskozite arttırıcı, film oluşturuca, nemlendirici ve cilt koruyucu olarak kullanılmaktadır (151,164,165).

Çalışmamızda kullandığımız kremlerden N1 ve N2 kodlu kremler hidrolize inci proteini, N3 kodlu krem ise hidrolize ipek proteini, N4 kodlu krem ise hidrolize soya proteini içermektedir. Çalışmamızdaki kremlerin içeriğinde bulunan inci, ipek ve soya proteinleri hidrolifik yapıdaki proteinler olduklarından dolayı emülsiyonlar tipi kremler için oldukça uygun yapılar olup herhangi bir stabilite sorununa yol açmamaktadırlar (164). Bu üç proteinin de nemlendirici, koruyucu, film oluşturuca ve irritasyonu önleyici etkisi bilinmektedir (164). Andrei-Frei ve arkadaşları soya proteinlerinin lipozomlarını yağ/su tipi emülsiyon ile karıştırıp deneklere bir ay boyunca günde iki kez uyguladıklarında soya peptidlerinin deriden emilerek fibroblastlara ulaşabildiklerini ve deride kollajen ve glikozaminoglikanların sentezinin arttığını tespit etmişlerdir (166). Ancak proteinlerin ve hidrolizatlarının, fibroblast hücrelerinin antioksidan aktiviteleri üzerine etkilerini aydınlatacak önemli bir çalışma literatürde yer almamaktadır (166,167). Bu nedenle, kozmesötiklerin içeriğinde bulunan protein ve hidrolizatlarının in vivo ve in vitro ortamlarda fibroblast hücrelerinin antioksidan savunma mekanizmalarını açıklayacak çalışmalara ihtiyaç vardır (166,168,169).

Kozmesötik preparatlarda kullanılan bir diğer grup olan aminoasitler, sulu çözeltilerinde stratum corneumdan geçerek fibroblastlara ulaşmaktadır (25,170,171). Amino asitlerin sulu çözeltilerinin uygun bir kozmetik taşıyıcı sistemiyle veya deriden emilimi arttıran yardımcı maddelerle birlikte kullanılması durumunda deriden

emilimlerinin kolaylaşabilmektedir (172). N4 kodlu kremde arjinin, glisin ve prolin aminoasitleri kullanılmıştır. Ayrıca N1 ve N2 kodlu kremlerde gliserin/palmitoil tripeptid-5 kullanılmıştır. Kozmesötiklerin içeriğinde bulunan tripeptidler, pentapeptidler ve hekzapeptidlerin deri yaşlanmasını engelleme, kırışıklıkları azaltma ve giderme gibi etkileri mevcuttur (151,173). Ancak, kozmesötik preparatlarda aminoasit ve polipeptid kullanımının deri fibroblastları üzerinde antioksidan etkiye sahip olup olmadığını bildiren bir bilgiye literatürde rastlanılmamıştır (151,173).

Bitkilerin veya bitkisel ürünlerin kozmesötik preparatlarda kullanımı çok uzun yıllar öncesine dayanmaktadır. Özellikle bitkisel ekstraktlar kozmesötiklerin içeriğindeki en önemli antioksidan kaynaklarıdır (151,174). 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 terapötik ve toksikolojik etkilerinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir (174).

Çalışmamızda kullandığımız kremlerde bitkisel ürün olarak, N1 ve N2 kodlu kremlerde kodlu kremde *Laminaria japonica* (konbu) ekstresi, *Usnea barbata* (sakal likeni) ekstresi, *Oryza sativa* (pirinç) kallus kültür ekstresi, *Zanthoxylum piperitum* (Japon biberi) ekstresi, *Angelica keiskei* (ashitaba) yaprak/kök ekstresi, *Aloe ferox* (sarısabır) ekstresi ve *Laminaria digitata* (deniz yosunu) ekstresi, N3 kodlu kremde *Saxifraga sarmentosa* (taşkıran çiçeği) ekstresi, *Morus nigra* (kara dut) kökü ekstresi, *Scutellaria baicalensis* (çin takke çiçeği) kökü ekstresi ve *Vitis vinifera* (üzüm) ekstresi, N4 kodlu kremde *Glycine soja* (soya fasulyesi) yağı, *Simmondsia Chinensis* (jojoba) yağı, *Pyrus malus* (elma) ekstresi, *Vitis vinifera* (üzüm) ekstresi, *Glycine soja* (soya fasulyesi) katı yağı, *Eucalyptus globulus* (okaliptus) ekstresi, *Geum Rivale* (karanfil kökü) ekstresi, *Lupinus albus* (acı bakla) ekstresi, *Oenothera biennis* (akşam sefası) yağı, *Vitis vinifera* (üzüm) çekirdeği yağı, *Thymus vulgaris* (kekik) ekstresi ve *Helianthus Annus* (ayçiçeği) çekirdeği yağı bulunmaktadır.

N1 ve N2 kodlu kremlerde yer alan kombu ekstresi, sakal likeni ekstresi, pirinç kallus kültür ekstresi, Japon biberi ekstresi, ashitaba yaprak/kök ekstresi, sarısabır ekstresi ve deniz yosunu ekstraktları cildi nemlendirir, şekillendirir ve korurken bu bitkisel maddelerden sadece Japon biberi ve deniz yosunu ekstraktlarının kısmı olarak

antioksidan özelliği bilinmektedir. Sarısabır bitkisinin ise antioksidan etkisi olduğu kadar prooksidan etkisi de bulunmaktadır (175,176). N1 ve N2 kodlu kremlerin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz ve SOD aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde artmamasının sebebinin bu kremlerde kullanılan bitkisel ürünlerin çok fazla antioksidan özellik göstermemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Buna paralel olarak da bu iki kremin uygulandığı hücrelerde MDA düzeylerindeki azalmanın diğer kremlere kıyasla fazla olmamasının sebebinin de bu nedenden kaynaklanabileceğini düşünüyoruz (18).

N3 kodlu kremlerde yer alan taşkıran çiçeği ekstresi renk açıcı olarak kullanılmaktadır. Bu kremin içeriğindeki çin takke çiçeği kökü ekstresi içerdiği polifenolik maddeler sayesinde, karadut kökü ekstresi içerdiği antosiyaninler sayesinde, üzüm ekstresi ise içerdiği biyoflavonoidler ve proantosiyanidinler sayesinde çok güçlü antioksidan özellik taşımaktadır (157,175,176). Yaptığımız çalışmada da N3 kodlu kremin uygulandığı hücrelerde katalaz aktivitesinin oldukça yüksek, MDA düzeyinin ise oldukça düşük çıkmasının sebebinin bu kremin içerdiği güçlü antioksidan moleküllerden kaynaklandığını düşünüyoruz. Bu kremin uygulandığı gruplarda SOD düzeyinin yeteri kadar artmamasının sebebinin, fibroblast hücreleri ortamdaki serbest radikalleri temizlerken SOD aktivitesinin oluşan oksidasyon ürünlerinin yok edilmesi sırasında tüketilmesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz (18,49).

N4 kodlu krem ise içerdiği elma, üzüm, soya fasülyesi, okaliptus, karanfilkökü, acı bakla ve kekik ekstreleri ve soya fasülyesi, jojoba yağı, akşam sefası, üzüm çekirdeği ve ayçiçeği çekirdeği yağları sayesinde cildin incelmelerini, kurumalarını yavaşlatır, yaşlanmayı geciktirir, cildi besler, cildi yeniler, onarır, şekillendirir ve cildin pH'sını dengeler (157,175,176). Ancak bu bitkisel ürünlerden soya fasülyesi ve jojoba yağı içerdiği isoflavonlar sayesinde güçlü bir antioksidan özellik taşımaktadır (75,157,174,176). Bunun yanı sıra soya fasülyesi ekstresi içerdiği genistein ve daidzein adlı isoflavonlar sayesinde, üzüm çekirdeği ekstresi içerdiği kateşin ve epigallokateşin gibi monomerik flavonoller, polifenolik proantosiyanidinler ve gallik ve elajik asit gibi bazı fenolik asitler sayesinde çok güçlü antioksidan özellik gösterirler (174,176). Yaptığımız çalışmada da bu bitkisel ürünleri içeren N4 kodlu anti-aging kremin uygulandığı fibroblast hücrelerinde katalaz aktivitesindeki artışın en fazla MDA düzeyindeki azalışın diğer kremlerin uygulandığı gruplara kıyasla en fazla olmasının

sebebinin, bu kremin içerdiği antioksidan özellikteki bitkisel ürünlerden kaynaklandığı kanaatindeyiz (18,49).

Görüldüğü gibi bitki özleri anti-aging preparatlarına en sık eklenen maddelerdendir. Literatürde çok sayıda bitkisel ekstrenin ve bileşiğın, deriyi oksidatif strese karşı koruduğuna dair bulgular yer almaktadır. Çalışmamızda kullandığımız kremlerde yer almayan ancak antioksidan etkisi ispat edilmiş birçok bitki ekstresi mevcuttur. Yeşil çay, siyah çay ve oolong çayı ekstreleri, gıngko biloba ekstresi, biberiye ekstresi, alg ekstresi ve devedikeninden elde edilen silimarin kozmetik ürünlerinde kullanılan diğer bitkisel ürünlerdir (19,63,75,77,165,174).

Yaptığımız çalışmada N1, N2, N3 ve N4 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 (18,49).

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 (18,49). 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 (18,49).

Yaptığımız çalışmada fibroblastlardaki katalaz ve SOD aktivitesindeki artışın en fazla olduğu grubun N4 kodlu kremin uygulandığı grup olduğu görülmüştür. N4 kodlu krem bir gece kremi olmakla birlikte içerisindeki A, C ve E vitaminleri ile antioksidan özellikteki bitkisel ürünler sayesinde güçlü bir serbest radikal süpürücü etkiye sahip olduğunu düşünmekteyiz (18,49,67). İkinci sırada yer alan N3 kodlu krem bir gündüz

kremler olup, N4 kodlu kremler aynı firmanın ürünüdür. Bu kremlerde bulunan C ve E vitaminleri ile antioksidan etkili bitki ekstraktları serbest radikal temizleyici olarak rol aldıklarını tahmin etmekteyiz (18,49). N1 ve N2 kodlu kremler de N3 ve N4 kodlu kremler kadar olmasa da katalaz ve SOD düzeylerinde artışa, MDA düzeylerinde azalmaya neden olmuşlardır. Ancak özellikle katalaz aktivitesindeki artışın diğer kremler kadar yüksek olmamasının sebebinin içerisinde antioksidan vitamin bulunmamasından ve muhteviyatında bulunan bitkisel ürünlerin antioksidan özelliğinden ziyade cildi nemlendirme, şekillendirme ve koruma etkisine sahip olduğundan kaynaklandığını düşünmekteyiz (18,49).

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 sisteminin daha fazla devreye girmesi ve serbest radikal süpürme etkisinin daha yoğun olmasından kaynaklandığı kanaatindeyiz (18,49).

Derideki antioksidan savunma sistemi son derece karmaşık bir yapıdan oluşup çok sayıda enzimatik ve non-enzimatik yapıdaki elemandan oluşur. Bu nedenle antioksidan olarak kullanılacak kozmesötik ürünün sadece tek bir antioksidan içermesinden önce birkaç antioksidan maddenin birlikte kullanılmasının daha iyi sonuç vereceği düşünülmektedir. Yaptığımız çalışmada da antioksidan vitaminlerle bitkisel ekstraktların bir arada kullanıldığı kremlerin antioksidan etkisinin daha fazla olduğu görülmektedir (18,61).

Hücrelerin canlılık yüzdelerine baktığımızda, 24. ve 48. saatin sonunda hücre sağ kalım oranlarının düştüğünü görmekteyiz. 24. saatin sonunda bu düşüşün en fazla olduğu grup sırasıyla N3, N4, N2 ve N1 olarak tespit edilmiştir. Tripan mavisiyle yaptığımız sayımlarda hücre canlılığındaki azalmanın kremlerin yapısındaki kimyasal maddelerden kaynaklandığını düşünmekteyiz (131,144,169). N3 kodlu krem içerdiği sodyum sülfid, sodyum metabisülfid, bütilparaben ve etilparaben gibi kimyasal koruyucular, hidroksietil üre gibi nemlendirici ajanlar ve benzofenon-3, etilheksil salisilat ve etilheksil metoksisinamat gibi kimyasal, titanyum dioksit gibi fiziksel güneş koruyucular nedeniyle hücre ölümüne neden olduğunu düşünmekteyiz (130,131,144,169). N4 kodlu krem içeriğindeki fosforik asit, izobütilparaben,

propilparaben, bütülpaben, etilparaben, ve metil paraben gibi kimyasal koruyucular ve imidazolidinil üre gibi nemlendirici ajanlar nedeniyle, N2 ve N1 kodlu kremler ise içeriğindeki metilparaben ve propilparaben gibi kimyasal koruyucular nedeniyle hücre ölümüne neden olduklarını zannetmekteyiz (177,178). 48. saatin sonundaki hücre ölümlerine bakıldığında en fazla ölümün sırasıyla N3, N4, N1 ve N2 kodlu kremlerin uygulandığı gruplarda olduğunu görmekteyiz. Görüldüğü gibi kremlerin içeriğindeki kimyasal maddeler arttıkça hücrelerin canlılık yüzdelerinde azalma gözlenmektedir (144,169,177,178). Tüm uygulama gruplarında 48. saatin sonundaki canlılık oranları, 24. saatin sonundaki canlılık oranlarına kıyasla daha düşük bulunmuştur. Bu veri ışığında, uzun süre anti-aging kremlerle inkübe edilen fibroblast hücrelerinde kimyasal maruziyet arttığından dolayı hücre canlılığında azalma meydana geldiğini söyleyebiliriz (177,178).

Çalışmamızda kullandığımız kremlerin aynı zamanda pH, viskozite ve emülsiyon tipi gibi fiziksel özelliklerini de inceledik. İncelenen anti-aging kremlerin pH'ları; N1 kodlu kremde 6.02, N2 kodlu kremde 6,36, N3 kodlu kremde 5,89 ve N4 kodlu kremde 5,94 olarak ölçülmüştür. Görüldüğü üzere tüm kremlerin pH değerleri 5,89-6,36 arasında değişmektedir. Cildin pH'sı ise 5.5-6.5 arasında değişmektedir (139,140). Kullandığımız tüm kremlerin cildin pH aralığında bulunması deri-krem uyumluluğu ve oluşabilecek bir alerjik irritasyonun önüne geçilebilmesi açısından önem taşımaktadır (139,140). 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 (139,140).

Çalışmamızda kullandığımız kremlerin viskozite değerlerini; N1 kodlu kremde 22.64 cP, N2 kodlu kremde 23,08 cP, N3 kodlu kremde 15,8 cP ve N4 kodlu kremde 18,06 cP olarak tespit ettik. Bu değerler aynı kremlerin ardı ardına 5 defa viskozitesinin ölçülmesi ve bulunan değerlerin ortalamasının alınmasıyla bulundu. Görüldüğü gibi aynı firmaya ait olan N1 ve N2 kodlu kremlerin viskoziteleri, diğer firmanın ürünleri olan N3 ve N4 kodlu kremlere nazaran daha yüksek bulunmuştur. Burada dikkati çeken bir diğer ayrıntı da her iki firmanın gece kremlerinin viskoziteleri yine aynı firmaların gündüz kremlerine kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebebinin gündüz

kremlerinin güneş ışığı altında fazla parlama yapmaması için daha ince bir yapıda, gece kremlerinin ise besleyici ve onarıcı bir etkiye sahip olabilmesi için daha yoğun bir yapıda olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz (139,140,151).

Elimizdeki tüm kremlerin emülsiyon tipleri incelendi ve hepsinin y/s tipi emülsiyon olduğu belirlendi. Çalışılan kremlerin y/s tipi emülsiyon olması, 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 bulunan hidrolize proteinler, aminoasitler, oligopeptidler, bitkisel ekstraktlar ve C vitamini su fazının içerisinde, A ve E vitaminleri ile bitkisel yağlar ise yağ fazının içerisinde çözünmektedir (67,77,140,152,165).

Antioksidanlar, bugün kozmetik bakım ürünlerinde güncelliklerini koruyan ve gün geçtikçe daha fazla ilgi odağı olan yapılardır (140,151). Yapılan bilimsel çalışmalar incelendiğinde çeşitli cilt bakım ürünlerinde yaşlılık belirtilerinin oluşumunu geciktirmek veya oluşmuş belirtilerin hafiflemesini sağlamak için birçok antioksidan mevcut olup, bu antioksidan molekülleri taşıyan çok sayıda farmasötik ürün geliştirilmiş ve üzerinde çalışılmıştır (139,140).

Deri üzerinde antioksidan etkiye sahip olabileceği düşünülen moleküller önce in vitro olarak antioksidan aktivite açısından değerlendirilmekte, daha sonra fibroblast ve keratinosit hücre kültürü üzerinde antioksidan aktivitelerine bakılmakta daha sonra gerek duyulursa hayvanlara uygulanarak in vivo ortamda deri antioksidanları üzerindeki etkileri ispatlanmaktadır (179-181). Daha sonra, bu antioksidan molekülleri içeren farmasötik preparatlar hazırlanmaktadır (139,179). Antioksidan moleküllerin kimyasal stabilitesindeki değişiklikler bu tarz farmasötik preparatlar için en önemli handikaplardan biridir. Bu nedenle son yıllarda mikroemülsiyonlar, nanoemülsiyonlar, lipozomlar, niozomlar, transferzomlar ve moleküler taşıyıcılar gibi dozaj şekillerinden, antioksidan moleküllerin bulunduğu kozmesötik ürünlerde sıklıkla yararlanılmaktadır (76,139,140,151,173).

Kozmesötik ürünlerin yapısına giren biyoaktif maddelerin deney hayvanları üzerindeki etkinlik çalışmaları yapılabilmesine rağmen bitmiş ürünlerin aynı şekilde incelenmesi gerek uygulamadaki zorluklar gerekse bazı etik problemler taşıdığından

dolayı pek tercih edilmemektedir. In vivo çalışmalarda deney hayvanlarında meydana gelen stres durumu zaman zaman deneyin sonuçlarını etkileyebilmektedir (182). Bitmiş kozmesötik ürünleriyle hayvanlar üzerinde yapılan draize (göz tahriş) testleri, LD50 (lethal doz) testleri ve dermal toksisite testleri oldukça etik tartışmalara yol açmıştır. Bu nedenle kozmesötik ürünlerin incelenmesinde in vivo deneylere alternatif yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla kozmesötik sanayisinde “skintex” adı verilen, insan derisine denk suni sistemler ve “eyetex” adlı verilen, insan gözüne denk suni sistemler kullanılmaktadır (182,183). Ayrıca, son yıllarda sitotoksosite, genotoksosite, mutajenite ve biyoetkinlik araştırmalarında hücre kültüründen yararlanılmaya başlanılmıştır (182,183). Kozmesötik ürünlerin hücre kültürü ortamında incelenmesi başta etik problemleri ortadan kaldırdığı gibi deney hayvanlarından kaynaklanan problemlerin önüne geçilmesinde ve sonuçların doğrudan insanlara yansıtılmasında oldukça kullanışlıdır. Ayrıca, kozmesötik çalışmalarında hayvan deneylerine alternatif yeni yöntemlerin geliştirilmesi, in vitro ve ex vivo yöntemlerden yararlanılması, kozmesötik ürünleri kullanırken bilinçli davranılması, matematik modellerden ve veri bankalarından yararlanılması çevreye ve insanlara saygılı bir yarımlar için oldukça önem taşımaktadır (76,140,182,183).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde son yıllarda önem kazanan ve hızla gelişen kozmetik sektöründe klasik yöntemler kullanılmaktadır. Oysa, insan deri fibroblastlarıyla gerçekleştirilecek hücre kültürü tekniğinin kozmetik ürünlerde etkinlik ve toksisite ile ilgili kontrol çalışmalarında kullanılması ile daha güvenli ve etkin ürünler elde edilmesi mümkün olacaktır. Bu tez çalışmasında amaçlanan ülkemizde anti-aging preparatlar üreten kozmetik sektöründe kalite kontrol çalışmalarında kullanılacak hücre kültürü tetkik yöntemlerinin geliştirilmesidir.

Literatürde hücre kültürü tekniğinin kozmetik ürünlerde kullanımına ait sadece birkaç çalışmanın yer alması, tezin başarılı olması halinde 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. Bu çalışmanın Farmasötik Biyoteknoloji'nin kozmetolojide önemli bir uygulama alanı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Laughrea M.** On the error theories of aging. A review of the experimental data. *Exp Gerontol*, **1982**; 17(4):305-317
2. **Schittek B, Paulmann M, Senyürek I, Steffen H.** The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets*, **2008**; 8(3):135-143.
3. **Candi E, Schmidt R, Melino G.** The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2005**; 6(4):328-340.
4. **Lai-Cheong JE, Arita K, McGrath JA.** Genetic diseases of junctions. *J Invest Dermatol*, **2007**; 127(12):2713-2725.
5. **Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Gaspard U, Piérard GE.** Skin climacteric aging and hormone replacement therapy. *J Cosmet Dermatol*, **2006**; 5(1):3-8.
6. **Stevenson S, Thornton J.** Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clin Interv Aging*, **2007**; 2(3):283-297.
7. **Mancoll JS, Wilhelmi BJ, Phillips LG.** Breast Reconstruction. In: Townsend CM Jr., Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL, Eds. *Sabiston Textbook of Surgery*, 16th Ed., Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company, **2000**, 591-601.
8. **Davis SC, Mertz PM, Eaglstein WH.** Second-degree burn healing: the effect of occlusive dressings and a cream. *J Surg Res*, **1990**; 48(3):245-248.
9. **Burleson R, Eiseman B.** Effect of skin dressings and topical antibiotics on healing of partial thickness skin wounds in rats. *Surg Gynecol Obstet*, **1973**; 136(6):958-960.
10. **Oikarinen A.** The aging of skin: chronoaging versus photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **1990**; 7(1):3-4.
11. **Gniadecka M, Nielsen OF, Wessel S, Heidenheim M, Christensen DH, Wulf HC.** Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *J Invest Dermatol*, **1998**; 111(6):1129-1133.
12. **Gilchrest BA.** A review of skin ageing and its medical therapy. *Br J Dermatol*, **1996**; 135(6):867-875.

13. **Geronemus RG, Mertz PM, Eaglstein WH.** Wound healing. The effects of topical antimicrobial agents. *Arch Dermatol*, **1979**; 115(11):1311-1314.
14. **Reed BV.** Effect of high voltage pulsed electrical stimulation on microvascular permeability to plasma proteins. A possible mechanism in minimizing edema. *Phys Ther*, **1988**; 68(4):491-495.
15. **Rodríguez-Bigas M, Cruz NI, Suárez A.** Comparative evaluation of aloe vera in the management of burn wounds in guinea pigs. *Plast Reconstr Sur*, **1988**; 81(3):386-389.
16. **Reich JD, Tarjan PP.** Electrical stimulation of skin. *Int J Dermatol*, **1990**; 29(6):395-400.
17. **Makrantonaki E, Zouboulis CC.** Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. *Ann N Y Acad Sci*, **2007**; 1119:40-50.
18. **Masaki H.** Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J Dermatol Sci*, **2010**; 58(2):85-90.
19. **Puizina-Ivić N, Mirić L, Carija A, Karlica D, Marasović D.** Modern approach to topical treatment of aging skin. *Coll Antropol*, **2010**; 34(3):1145-1153.
20. **Rubin H.** Cell aging in vivo and in vitro. *Mech Ageing Dev*, **1997**; 98(1):1-35.
21. Hepgül, G. Cilt: Yapısı ve Fonksiyonları. Erişim: <http://www.genetikbilimi.com/genbilim/ciltyapisi.htm> Erişim tarihi: 11.03.2012.
22. **Kanitakis J.** Immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, **1998**; 8(8):539-547.
23. **Elias PM, Menon GK.** Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv Lipid Res*, **1991**; 24:1-26.
24. **Chan LS.** Human skin basement membrane in health and in autoimmune diseases. *Front Biosci*, **1997**; 2:343-352.
25. **Pouillot A, Dayan N, Polla AS, Polla LL, Polla BS.** The stratum corneum: a double paradox. *J Cosmet Dermatol*, **2008**; 7(2):143-148.
26. **Gentzkow GD.** Electrical stimulation to heal dermal wounds. *J Dermatol Surg Oncol*, **1993**; 19(8):753-758.
27. **Berardesca E, Borrioni G.** Instrumental evaluation of cutaneous hydration. *Clin Dermatol*, **1995**; 13(4):323-327.

28. **Lin JY, Fisher DE.** Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*, **2007**; 445(7130):843-850.
29. **Lappin MB, Kimber I, Norval M.** The role of dendritic cells in cutaneous immunity. *Arch Dermatol Res*, **1996**; 288(3):109-121.
30. **Meunier L.** Ultraviolet light and dendritic cells. *Eur J Dermatol*, **1999**; 9(4):269-275.
31. **Romani N, Clausen BE, Stoitzner P.** Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev*, **2010**; 234(1):120-141.
32. **O'Rourke H, Meyers SP, Katzman PJ.** Merkel cell carcinoma of the foot: case report and review of the literature. *J Foot Ankle Surg*, **2007**; 46(3):196-200.
33. **Smith KL, Dean SJ.** Tissue repair of the epidermis and dermis. *J Hand Ther*, **1998**; 11(2):95-104.
34. **Roberts MS.** Targeted drug delivery to the skin and deeper tissues: role of physiology, solute structure and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **1997**; 24(11):874-879.
35. **Wysocki AB.** Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs Clin North Am*, **1999**; 34(4):777-797.
36. **Matsuzaki T, Yoshizato K.** Role of hair papilla cells on induction and regeneration processes of hair follicles. *Wound Repair Regen*, **1998**; 6(6):524-530.
37. **Kanitakis J.** Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, **2002**; 12(4):390-9.
38. **Loomis CA.** Development and morphogenesis of the skin. *Adv Dermatol*, **2001**; 17:183-210.
39. **Zouboulis CC, Boschnakow A.** Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland. *Clin Exp Dermatol*, **2001**; 26(7):600-607.
40. **Carlson BM.** The skin and its derivatives. In: *Patten's Foundations of Embryology*. 6th Ed., McGraw-Hill New-York, 1996.
41. **Correale CE, Walker C, Murphy L, Craig TJ.** Atopic dermatitis: a review of diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*, **1999**; 60(4):1191-1198.
42. **Fassihi H, Wong T, Wessagowit V, McGrath JA, Mellerio JE.** Target proteins in inherited and acquired blistering skin disorders. *Clin Exp Dermatol*, **2006**; 31(2):252-259.

43. **Giacomoni PU, Rein G.** A mechanistic model for the aging of human skin. *Micron*, **2004**; 35(3):179-184.
44. **Jackson R.** Elderly and sun-affected skin. Distinguishing between changes caused by aging and changes caused by habitual exposure to sun. *Can Fam Physician*, **2001**; 47:1236-1243.
45. **Boukamp P.** Skin aging: a role for telomerase and telomere dynamics? *Curr Mol Med*, **2005**; 5(2):171-177.
46. **Sjerobabski Masnec I, Poduje S.** Photoaging. *Coll Antropol*, **2008**; 32 (2):177-180.
47. **Amano S.** Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. *J Investig Dermatol Symp Proc*, **2009**; 14(1):2-7.
48. **Thornton MJ.** The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol*, **2002**; 11(6):487-502.
49. **Girotti AW, Kriska T.** Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid Redox Signal*, **2004**; 6(2):301-310.
50. **Wang B.** Photoaging: a review of current concepts of pathogenesis. *J Cutan Med Surg*, **2011**; 15(1):374-377.
51. **Limpiangkanan W, Limpiangkanan W.** Photo-aging: a literature review. *J Med Assoc Thai*, **2010**; 93(6):753-757.
52. **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.
53. **Puizina-Ivić N.** Skin aging. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, **2008**; 17(2):47-54.
54. **Cals-Grierson MM, Ormerod AD.** Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide*, **2004**; 10(4):179-193.
55. **Lowe NJ.** An overview of ultraviolet radiation, sunscreens, and photo-induced dermatoses. *Dermatol Clin*, **2006**; 24(1):9-17.
56. **Calleja-Agius J, Muscat-Baron Y, Brincat MP.** Skin ageing. *Menopause Int*, **2007**; 13(2):60-64.
57. **Boelsma E, Gibbs S, Ponc M.** Expression of skin-derived antileukoproteinase (SKALP) in reconstructed human epidermis and its value as a marker for skin irritation. *Acta Derm Venereol*, **1998**; 78(2):107-113.

58. **Boulais N, Misery L.** The epidermis: a sensory tissue. *Eur J Dermatol*, **2008**; 18(2):119-127.
59. **Johnson-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.
60. **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.
61. **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.
62. **Mathers AR, Larregina AT.** Professional antigen-presenting cells of the skin. *Immunol Res*, **2006**; 36(1-3):127-136.
63. **Baumann L.** Skin ageing and its treatment. *J Pathol*, **2007**; 211(2):241-251.
64. **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.
65. **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.
66. **Baumann L.** Skin ageing and its treatment. *J Pathol*, **2007**; 211(2):241-251.
67. **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.
68. **Dover JS, Hruza GJ.** Laser skin resurfacing. *Semin Cutan Med Surg*, **1996**; 15(3):177-188.
69. **Biesman BS.** Carbon dioxide laser skin resurfacing. *Semin Ophthalmol*, **1998**; 13(3):123-135.
70. **Bernstein EF, Andersen D, Zelickson BD.** Laser resurfacing for dermal photoaging. *Clin Plast Surg*, **2000**; 27(2):221-240.
71. **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.
72. **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.

73. **Puizina-Ivić N.** Skin aging. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat*, **2008**; 17(2):47-54.
74. **Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Voorhees JJ.** Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol*, **1999**; 69(2):154-157.
75. **Vranesić-Bender D.** The role of nutraceuticals in anti-aging medicine. *Acta Clin Croat*, **2010**; 49(4):537-544.
76. **Delalle-Lozica N.** Local therapy as basic anti-aging prevention. *Acta Clin Croat*, **2010**; 49(4):529-536.
77. **Hsu S.** Green tea and the skin. *J Am Acad Dermatol*, **2005**; 52(6):1049-1059.
78. **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.
79. **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.
80. **Kuhn MA.** Oxygen free radicals and antioxidants. *Am J Nurs*, **2003**; 103(4):58-62.
81. **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.
82. **Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P.** Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*, **1997**; 43(4):562-568.
83. **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.
84. **Atlan N, Dincel AS, Koca C.** Diabetes mellitus and oxidative stress. *Turk J Biochem*, **2006**; 31(2):51-56.
85. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine*. 3rd Ed., London: Oxford Science publications, **2001**:22-24.
86. **Halliwell B.** Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, **1991**; 91(C3):14-21.
87. **Freeman BA, Crapo JD.** Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* **1982**; 47(5):412-426.

88. **Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine.* 2nd Ed., Oxford: Clarendon Pres, **1989**: 432-433.
89. **Harris RJ, Symon L, Branston NM, Bayhan M.** Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, **1981**; 1(2):203-209.
90. **Dargel R.** Lipid peroxidation a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxic Pathol*, **1992**; 44(4):169-181.
91. **Gutteridge JMC, Halliwell B.** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci*, **1990**; 15(4):129-135.
92. **Southorn PA, Powis G.** Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proc*, **1988**; 63(4):381-389.
93. **Abrescia P, Golino P.** Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, **2005**; 3(1):159-171.
94. **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.
95. **Halliwell B.** Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, **1995**; 49(10):1341-1348.
96. **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.
97. **Fang YZ, Yang S, Wu G.** Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, **2002**; 18(10):872-879.
98. **Leopold JA, Loscalzo J.** Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler thromb Vasc Biol*, **2005**; 25(7):1332-1340.
99. **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.
100. **Bompart 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.
101. **Akyol Ö.** Oxidative stress in schizophrenia. *The Medical Journal of Kocatepe*, **2004**; ek sayı:15-25.

102. **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.
103. **Shidhu P, Garg ML, Dhawan DK.** Protective role of zinc in nickel induced hepatotoxicity in rats. *Chemico-Biological Interactionz*, **2004**; 150(2):199-209.
104. **Liebert J, Matlawska I, Bylka W, Murias M.** Protective effect of aquilegia vulgaris on APAP induced oxidative stress in rats. *J Ethnopharm*, **2005**; 97(2):351-358.
105. **Talwar DK.** Biological variation of vitamin in blood of healthy individuals. *Clinical Chemistry*, **2005**; 51(11):240-246.
106. **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.
107. **Burtis CA, Ashwood ER.** *Tietz fundamental of clinical chemistry*. 2nd Ed. USA Saunders Company, **1994**: 251-258.
108. **Rose RC, Bode AM.** Biology of free radical scavengers an evaluation of ascorbate. *FASEB J*, **1993**; 7(12):1135-1142.
109. **Robert FC.** Vitamin C: The nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. *Medical Hypotheses*, **1985**; 18(1):61-77.
110. **Traber MG.** Utilization of vitamin E. *Biofactors*. **1999**; 10(2-3):115-120.
111. **Schneider C.** Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res*, **2005**; 49(1):7-30.
112. **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.
113. **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.
114. **Bhattacharya CG.** A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. *Biometrics*, **1967**; 23(1):115-135.
115. **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.
116. **Bohles H.** Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Int J Vitam Nutr Res*, **1997**; 67(5):321-328.

117. **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-treated human erythrocytes. *Free Radic Biol Med*, **2001**; 30(3):232-237.
118. **Helmrich A, Barnes D.** Animal cell culture equipment and techniques. *Methods Cell Biol*, **1998**; 57:3-17.
119. **Stulberg CS, Coriell LL, Kniazeff AJ, Shannon JE.** The animal cell culture collection. *In Vitro*, **1970**; 5:1-16.
120. 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
121. **Perlman D.** Value of mammalian cell culture as a biochemical tool. *Science*, **1968**; 160(3823):42-46.
122. **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.
123. **Baserga R, Wiebel F.** The cell cycle of mammalian cells. *Int Rev Exp Pathol*, **1969**; 7:1-30.
124. **Thomas DB.** Regulation of the mammalian cell cycle in vitro? *Biochem Soc Trans*, **1977**; 5(6):1801-1808.
125. **Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollefsbol TO.** Aging cell culture: methods and observations. *Methods Mol Biol*, **2007**; 371:9-19.
126. **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.
127. **Hof JO.** Human cells in culture: revisited. *S Afr Med J*, **1972**; 45(24):672-674.
128. **Oka MS, Rupp RG.** Large-scale animal cell culture: a biological perspective. *Bioprocess Technol*, **1990**; 10:71-92.
129. **Marx U.** Trends in cell culture technology. *Adv Exp Med Biol*, **2012**; 745:26-46.
130. **Mather JP.** In vitro models. *Stem Cells*, **2012**; 30(2):95-99.
131. **Petricciani J, Sheets R.** An overview of animal cell substrates for biological products. *Biologicals*, **2008**; 36(6):359-362.

132. **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.
133. **Littlefield JW.** Control mechanisms in animal cell cultures. *Arch Biochem Biophys*, **1968**; 125(2):410-415.
134. **Alavi A, Stupack DG.** Cell survival in a three-dimensional matrix. *Methods Enzymol*, **2007**; 426:85-101.
135. **Pitot HC, Jost JP.** Control of biochemical expression in morphologically related cells in vivo and in vitro. *Natl Cancer Inst Monogr*, **1967**; 26:145-166.
136. **Puck TT.** Biochemical and genetic studies on mammalian cells. *In Vitro*, **1971**; 7(3):115-119.
137. **Cuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I.** Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discov Today*, **2010**; 15(15-16):610-621.
138. **Rinkevich B.** Cell cultures from marine invertebrates: new insights for capturing endless stemness. *Mar Biotechnol (NY)*, **2011**; 13(3):345-354.
139. **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.
140. **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.
141. **Smith JR, Lincoln DW 2nd.** Aging of cells in culture. *Int Rev Cytol*, **1984**; 89:151-177.
142. **Reff M, Schneider EL.** Cell culture aging. *Mol Cell Biochem*, **1981**; 36(3):169-176.
143. **Poot M.** Oxidants and antioxidants in proliferative senescence. *Mutat Res*, **1991**; 256(2-6):177-189.
144. **Harley CB, Sherwood SW.** Aging of cultured human skin fibroblasts. *Methods Mol Biol*, **1997**; 75:23-30.
145. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem*, **1961**; 193(1):265-275.
146. **Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **1984**; 105:121-126.

147. **Sun Y, Oberley LW, Ying L.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, **1988**; 34(3):497-500.
148. **Yagi K.** Simple procedure for specific enzyme of lipid hydroperoxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* **1998**;108:107-110.
149. SPSS Inc. SPSS for windows. Version 16.0, Chicago: SPSS Inc., **2007**.
150. **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.
151. **Yu BP.** Approaches to anti-aging intervention: the promises and the uncertainties. *Mech Ageing Dev*, **1999**; 111(2-3):73-87.
152. **Glaser DA.** Anti-aging products and cosmeceuticals. *Facial Plast Surg Clin North Am*, **2004**; 12(3):363-372.
153. **Buckingham EM, Klingelutz AJ.** The role of telomeres in the ageing of human skin. *Exp Dermatol*, **2011**; 20(4):297-302.
154. **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.
155. **Podda M, Grundmann-Kollmann M.** Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol*, **2001**; 26(7):578-582.
156. **Miyachi Y.** Photoaging from an oxidative standpoint. *J Dermatol Sci*, **1995**; 9(2):79-86.
157. **Morré DM, Lenaz G, Morré DJ.** Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J Exp Biol*, **2000**; 203(10):1513-1521.
158. **Pinnell SR.** Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med*, **1985**; 58(6):553-559.
159. **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.
160. **Thiele JJ, Schroeter C, Hsieh SN, Podda M, Packer L.** The antioxidant network of the stratum corneum. *Curr Probl Dermatol*, **2001**; 29:26-42.
161. **Gallardo V, Muñoz M, Ruíz MA.** Formulations of hydrogels and lipogels with vitamin E. *J Cosmet Dermatol*, **2005**; 4(3):187-192.

162. **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.
163. **Shapiro SS, Mott DJ.** Modulation of glycosaminoglycan biosynthesis by retinoids. *Ann N Y Acad Sci*, **1981**; 359:306-321.
164. **Li GY, Fukunaga S, Takenouchi K, Nakamura F.** Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. *Int J Cosmet Sci*, **2005**; 27(2):101-106.
165. **Stowe CB.** The effects of pomegranate juice consumption on blood pressure and cardiovascular health. *Complement Ther Clin Pract*, **2011**; 17(2):113-115.
166. **Andre-Frei V, Perrier E, Augustin C, Damour O, Bordat P, Schumann K, Förster T, Waldmann-Laue M.** A comparison of biological activities of a new soya biopeptide studied in an in vitro skin equivalent model and human volunteers. *Int J Cosmet Sci*, **1999**; 21(5):299-311.
167. **Franks LM.** Ageing in differentiated cells. *Gerontologia*, **1974**; 20(1):51-62.
168. **Schneider EL, Smith JR.** The relationship of in vitro studies to in vivo human aging. *Int Rev Cytol*, **1981**; 69:261-270.
169. **Brown TR, Migeon CJ.** Cultured human skin fibroblasts: a model for the study of androgen action. *Mol Cell Biochem*, **1981**; 36(1):3-22.
170. **Semlin L, Schäfer-Korting M, Borelli C, Korting HC.** In vitro models for human skin disease. *Drug Discov Today*, **2011**; 16(3-4):132-139.
171. **Krueger GG.** Fibroblasts and dermal gene therapy: a minireview. *Hum Gene Ther*, **2000**; 11(16):2289-2296.
172. **Pomahac B, Svensjö T, Yao F, Brown H, Eriksson E.** Tissue engineering of skin. *Crit Rev Oral Biol Med*, **1998**; 9(3):333-344.
173. **Prausnitz MR, Langer R.** Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*, **2008**; 26(11):1261-1268.
174. **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.
175. **al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P.** Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol*, **1999**; 37(2):124-130.

176. **Damour O, Augustin C, Black AF.** Applications of reconstructed skin models in pharmacotoxicological trials. *Med Biol Eng Comput*, **1998**; 36(6):825-832.
177. **Welss T, Basketter DA, Schröder KR.** In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol In Vitro*, **2004**; 18(3):231-243.
178. **Bayreuther K, Franz PI, Gogol J, Hapke C, Maier M, Meinrath HG.** Differentiation of primary and secondary fibroblasts in cell culture systems. *Mutat Res*, **1991**;256(2-6): 233-242.
179. **Armandola E.** Time and the biology of aging. *MedGenMed*, **2005**; 7(1):24.
180. **Kuro-o M.** Disease model: human aging. *Trends Mol Med*, **2001**; 7(4):179-181.
181. **Troen BR.** The biology of aging. *Mt Sinai J Med*, **2003**; 70(1):3-22.
182. **Praeger B.** In-vitro studies of aging. *Dermatol Clin*, **1986**; 4(3):359-369.
183. **Prunieras M.** Culture of the skin: how and why. *Int J Dermatol*, **1975**; 14(1):12-22.

ÖZGEÇMİŞ

30 Ağustos 1979 tarihinde Mersin’de doğdu. İlkokulu Mersin’de Barbaros İlkokulu’nda, orta ve liseyi İçel Anadolu Lisesi’de tamamladı. 1998 yılında girdiği İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü’nden 2002 yılında mezun oldu. 2003-2004 yılları arasında Ağrı’da bulunan 12. Mekanize Piyade Tugayı’nda vatani hizmetini yaptı. 2004 yılında başladığı Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’ndaki yüksek lisans eğitimini 2007 yılında tamamladı. 2009 yılında Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı yıl araştırma görevlisi kadrosuna atandı. Halen aynı bölümde yüksek lisans öğrencisi olarak devam etmektedir.