

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASTAKSANTİNİN ANTIOKSİDAN ETKİLİ TOPİKAL FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Hafize Bilge EREN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Özgen ÖZER

Yardımcı Danışman

Yrd. Doç. Dr. Mesut ARICI

İZMİR

2014

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASTAKSANTİNİN ANTIOKSİDAN ETKİLİ TOPİKAL FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Hafize Bilge EREN

DANIŞMAN

Prof. Dr. Özgen ÖZER

Yardımcı Danışman

Yrd. Doç. Dr. Mesut ARICI

İZMİR

2014

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Özgen ÖZER

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Gökhan ERTAN

Üye : Prof. Dr. Nilüfer TARIMCI

Üye : Prof. Dr. Sema ÇALIŞ

Üye : Doç. Dr. Mine ÖZYAZICI

.....

.....

.....

.....

.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 04/07/2014

ÖNSÖZ

Tezimin tüm aşamalarında bilgi, tecrübe ve tavsiyelerinden yararlandığım, pozitif enerjisi ve güleryüzü ile desteğini hissettiğim, beni Kozmetoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisansa yönlendiren ve yüksek lisans süresince motive eden, bana yeni bakış açıları ve bilimsel düşünme yeteneği kazandıran, kendimi geliştirmemde öncülük eden değerli danışman hocam Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özgen ÖZER'e,

5. sınıf bitirme tezimde danışmanım olan ve her zaman desteğini hissettiğim hocam, Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı ve Ege Üniversitesi Senato Üyesi Prof. Dr. Gökhan ERTAN'a,

Çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen ve yol gösteren değerli yardımcı danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mesut ARICI'ya,

Tez çalışması sırasındaki çözüm odaklı fikirleriyle yeni bir yol çizmeye yardım eden Arş. Gör. Dr. Sakine TUNCAY TANRIVERDİ'ye,

Tez çalışmasında kullanılan astaksantin içeren alg ekstresini gönderen, Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nden Sayın Yrd. Doç. Dr. Selin SAYIN'a,

Teze başladığım ilk günden başlayıp son ana kadar her konuda desteklerini esirgemeyen, kendimi güçsüz ve mutsuz hissettiğim, umutsuzluğa kapıldığım her anda yanımda olan, samimiyetlerini en derinden hissettiğim, bana daima güç ve enerji veren, yoluma ışık tutan kahramanlarım Arş. Gör. Ecz. Gülçin AZİZOĞLU ve Arş. Gör. Uzm. Ecz. Erkan AZİZOĞLU'na,

Reoloji ve viskozite tayini çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Sinem Yaprak KARAVANA ve Arş. Gör. Dr. Seda RENÇBER'e,

TPA çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Dr. Zeynep ŞENYİĞİT'e,

Antioksidan aktivite tayini ve hücre kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Fadime AYDIN KÖSE'ye,

Tezim sırasındaki destek ve yardımlarından dolayı tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve araştırma görevlilerine,

Tezim sırasında tanıştığım ve moral kaynağım olan, en zor anlarımda yanımda olan ve içimi rahatlatan, yardımlarını esirgemeyen canım arkadaşım Ecz. Başak Mine YİĞİT'e,

Çalışmalarına mola verdiğim anlarda sohbetleriyle güç veren, yüzümü gülümseten, başta Arş. Gör. Ecz. Elif Gizem TAŞKIRAN olmak üzere yüksek lisans ve doktora öğrencileri laboratuvarındaki tüm arkadaşlarıma,

Hayatıma eşlik etmelerinden her zaman mutlu olduğum, yaşamım boyunca başarıya uzanan tüm zorlu süreçlerde bana destek olan, tezim süresince de moral ve güç veren canım annem Hatice EREN, canım babam Şinasi EREN ve biricik kardeşim Ahmet Onur EREN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ecz. Hafize Bilge EREN

Temmuz 2014

Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 14/ECZ/004 nolu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	II
İÇİNDEKİLER	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XII
GİRİŞ VE AMAÇ.....	XIII
I. BÖLÜM	1
1 GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Deri Hakkında Genel Bilgiler	1
1.1.1 Derinin Yapısı ve Özellikleri	1
1.1.2 Epidermis	2
1.1.3 Dermis	4
1.1.4 Hipodermis.....	5
1.1.5 Etkin Maddelerin Deriden Geçiş Yolları	5
1.1.5.1 Porlardan ya da boşluklardan geçiş	6
1.1.5.2 Hücreleriçi geçiş (Transselüler yol)	6
1.1.5.3 Hücrelerarası geçiş (İnterselüler yol)	6
1.1.6 Deriden Geçiş Etkileyen Faktörler	6
1.1.6.1 Biyolojik Faktörler	6
1.1.6.2 Fizikokimyasal Faktörler.....	8
1.2 Yaşlanma Hakkında Genel Bilgiler.....	9
1.2.1 Yaşlanma	9
1.2.2 Serbest Radikal Teorisi	10
1.2.3 Yaşlanma Karşıtı Alanda Topikal Olarak Kullanılan Ajanlar	10
1.3 Serbest Radikaller (Oksidanlar) ve Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgiler.....	11
1.3.1 Serbest Radikaller (Oksidanlar).....	11
1.3.2 Oksidatif Stres	12
1.3.3 Antioksidanlar	13
1.3.3.1 Enzimatik Antioksidanlar.....	13
1.3.3.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)	13
1.3.3.1.2 Katalaz.....	14

1.3.3.1.3	Glutatyon Peroksidaz	14
1.3.3.1.4	Glutatyon Redüktaz	14
1.3.3.1.5	Glutatyon S – Transferaz	14
1.3.3.2	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	14
1.3.3.2.1	C Vitamini	14
1.3.3.2.2	E Vitamini	15
1.3.3.2.3	Karotenoidler	16
1.3.3.2.4	Glutatyon	17
1.3.3.2.5	Polifenoller	17
1.3.3.2.6	Koenzim Q10	18
1.3.3.2.7	Selenyum	18
1.4	Jeller Hakkında Genel Bilgiler	19
1.4.1	Jel Tanımı	19
1.4.2	Jellerin Sınıflandırılması	19
1.4.2.1	Tek fazlı sistemler	19
1.4.2.2	İki fazlı sistemler	19
1.4.3	Jel Oluşma Mekanizmaları	20
1.4.4	Jellerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler	21
1.4.4.1	Doğal Polimerler	21
1.4.4.1.1	Proteinler	21
1.4.4.1.2	Polisakkaritler	21
1.4.4.2	Yarısentetik Polimerler	22
1.4.4.3	Sentetik Polimerler	22
1.4.4.3.1	Karbopol	22
1.4.4.3.2	Kitozan	22
1.4.4.3.3	Poloksamer	23
1.4.5	Hidrojeller	23
1.4.6	Organojeller	24
1.4.7	Jellerin Reolojik Ve Mekanik Özellikleri	25
1.4.7.1	Reolojik Özellikleri (Akış özellikleri)	26
1.4.7.1.1	Newton Akışı	26
1.4.7.1.2	Newton Olmayan Akış Tipleri	26
1.4.7.2	Tiksotropi	28
1.4.7.3	Dinamik Özellikler	29

1.4.7.3.1 Viskoelastisite	29
1.4.7.4 Mekanik Özellikleri.....	30
1.5 Astaksantin Hakkında Genel Bilgiler	31
1.5.1 Astaksantin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	31
1.5.2 Astaksantin Kaynakları	32
1.5.3 Astaksantin Endikasyonları	32
1.5.4 Astaksantin Antioksidan Etkisi	33
1.5.5 Astaksantin Ticari Preparatları	34
II. BÖLÜM	35
2 PRATİK ÇALIŞMALAR	35
2.1 Kullanılan Maddeler, Araç ve Gereçler	35
2.1.1 Kullanılan Maddeler	35
2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler	36
2.2 Yöntem ve Deneyler.....	37
2.2.1 Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar	37
2.2.1.1 Astaksantin Infrared (IR) Analizi.....	37
2.2.1.2 Astaksantin Ultraviyole Spektroskopisi.....	37
2.2.2 Etkin Madde Miktar Tayini Çalışmaları	37
2.2.2.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Çalışmaları	37
2.2.3 Analitik Yöntem Validasyonu	37
2.2.3.1 Doğrusallık.....	38
2.2.3.2 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik.....	38
2.2.3.3 Kesinlik	39
2.2.3.3.1 Tekrar Edilebilirlik	39
2.2.3.3.2 Tekrar Elde Edilebilirlik.....	39
2.2.3.4 Özgünlük, seçicilik	40
2.2.3.5 Stabilite	40
2.2.3.6 Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	40
2.2.4 Astaksantin İçeren Alg Ekstresinin Çözünürlük Çalışması	40
2.2.5 Astaksantin İçeren Alg Ekstresindeki Astaksantin Miktarı Tayini.....	41
2.2.6 Formülasyon Çalışmaları	41
2.2.6.1 Formülasyonların Hazırlanması.....	41
2.2.6.1.1 Astaksantin %5 Oleoresin Lipojel (AO-L) Hazırlanması	41
2.2.6.1.2 Astaksantin %5 Oleoresin Karbopol Jel (AO-K) Hazırlanması.....	41

2.2.6.1.3 Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Lipojel (AE-L) Hazırlanması.....	41
2.2.6.1.4 Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Karbopol Jel (AE-K) Hazırlanması	42
2.2.6.2 Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları	42
2.2.6.2.1 Makroskobik İncelemeler.....	42
2.2.6.2.2 pH Ölçümleri	42
2.2.6.2.3 Reoloji ve Viskozite Tayini	42
2.2.6.2.4 Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayini.....	43
2.2.6.2.4.1 Jellerin Sertliği	44
2.2.6.2.4.2 Jellerin Sıkıştırılabilirliği.....	44
2.2.6.2.4.3 Jellerin Adezifliği	44
2.2.6.2.4.4 Jellerin Kohezifliği.....	45
2.2.6.2.4.5 Jellerin Elastikiyeti.....	45
2.2.6.2.5 Etkin Madde Miktar Tayini.....	46
2.2.6.3 Formülasyonların Stabilite Çalışmaları.....	46
2.2.7 <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	46
2.2.8 Antioksidan Aktivite Tayini Çalışmaları	46
2.2.8.1 Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi Tayini.....	47
2.2.8.2 Total Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini Yöntemi	48
2.2.9 Hücre Kültürü Çalışmaları	50
2.2.9.1 Sitotoksosite Testi	50
2.2.10 Araştırma Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi	51
III. BÖLÜM	52
3 BULGULAR.....	52
3.1 Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular.....	52
3.1.1 Astaksantin'in Infrared (IR) Analizine Ait Bulgular	52
3.1.2 Astaksantin'in Ultraviyole (UV) Spektroskopisine Ait Bulgular	52
3.2 Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular	53
3.2.1 Doğrusallık.....	53
3.2.2 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik.....	54
3.2.3 Kesinlik	55
3.2.3.1 Tekrar Edilebilirlik	55
3.2.3.2 Tekrar Elde Edilebilirlik.....	55
3.2.4 Özgünlük, seçicilik	56
3.2.5 Stabilite	57

3.2.6 Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ).....	57
3.3 Astaksantin İçeren Alg Ekstresinin Çözünürlük Çalışmasına Ait Bulgular	57
3.4 Astaksantin İçeren Alg Ekstresindeki Astaksantin Miktarı Tayinine Ait Bulgular.....	57
3.5 Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	58
3.5.1 Makroskobik İncelemeler ve pH Ölçümlerine Ait Bulgular	58
3.5.2 Reoloji ve Viskozite Tayinine Ait Bulgular	58
3.5.3 Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayinine Ait Bulgular	62
3.5.4 Etkin Madde Miktar Tayinine Ait Bulgular	65
3.6 Formülasyonların Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	65
3.7 In Vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular.....	69
3.8 Antioksidan Aktivite Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular	71
3.8.1 Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi Tayini.....	71
3.8.2 Total Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini Yöntemi	72
3.9 Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular.....	73
3.9.1 Sitotoksikite Testine Ait Bulgular	73
IV. BÖLÜM	74
TARTIŞMA.....	74
SONUÇ.....	83
V. BÖLÜM.....	84
ÖZET	84
VI. BÖLÜM	86
YARARLANILAN KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

UV	Ultraviyole
SC	Stratum Korneum
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
USP	Amerikan Farmakopesi
BP	İngiliz Farmakopesi
PVA	Polivinil Alkol
TPA	Texture Profile Analizi
IR	Infrared
YBSK	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
DAD	Photodiode Array Detector
DMSO	Dimetil Sülfoksit
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
TAK	Total Antioksidan Kapasite
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenz-tiazoline-6-sülfonik asit)
TEAK	Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite
AE-L	Astaksantin içeren alg ekstresi lipojel
AE-K	Astaksantin içeren alg ekstresi karbopol jel
AO-L	Astaksantin %5 oleoresin lipojel

AO-K	Astaksantin %5 oleoresin karbopol jel
X	Aritmetik ortalama
SS	Standart sapma
VK	Varyasyon katsayısı
LOD	Teşhis Sınırı
LOQ	Tayin Sınırı
AE-K-S	3 ay boyunca stabilite kabininde, 25°C sıcaklık- % 60 relatif rutubet koşullarında bekletilmiş Astaksantin içeren alg ekstresi karbopol jel
AE-L-S	3 ay boyunca stabilite kabininde, 25°C sıcaklık- % 60 relatif rutubet koşullarında bekletilmiş Astaksantin içeren alg ekstresi lipojel
AO-K-S	3 ay boyunca stabilite kabininde, 25°C sıcaklık- % 60 relatif rutubet koşullarında bekletilmiş Astaksantin %5 oleoresin karbopol jel
AO-L-S	3 ay boyunca stabilite kabininde, 25°C sıcaklık- % 60 relatif rutubet koşullarında bekletilmiş Astaksantin %5 oleoresin lipojel
İPM	İsopropil Miristat
PG	Propilen Glikol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Derinin Yapısı.....	2
Şekil 2. Epidermisin Yapısı	3
Şekil 3. Etkin Maddelerin Deriden Geçiş Yolları	5
Şekil 4. Plastik Akış Eğrileri.....	26
Şekil 5. Psödoplastik Akış Eğrileri	27
Şekil 6. Dilatan Akış Eğrileri.....	28
Şekil 7. TA-XT Plus, Stable Micro System cihazı.....	30
Şekil 8. Astaksantin Kimyasal Yapısı.....	31
Şekil 9. Astaksantin İçeren Toz Alg Ekstresi	31
Şekil 10. Astaksantin %5 Oleoresin.....	32
Şekil 11. Haake osilasyon reometre.....	43
Şekil 12. Jel formülasyonuna ait TPA grafiği.....	45
Şekil 13. DPPH radikalinin kimyasal formülü.....	48
Şekil 14. ABTS'nin potasyum persülfatla oksidasyonu	49
Şekil 15. Astaksantin IR Spektrumu	52
Şekil 16. Astaksantin %5 Oleoresin'in UV Spektrumu	53
Şekil 17. Astaksantin içeren alg ekstresinin UV spektrumu.....	53
Şekil 18. Astaksantin YBSK ile elde edilen standart doğrusu	54
Şekil 19. Astaksantin %5 oleoresin'in YBSK ile elde edilen pik grafiği	56
Şekil 20. Astaksantin içeren alg ekstresinin YBSK ile elde edilen pik grafiği.....	56
Şekil 21. Jel Formülasyonlarının 25 °C'deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği.....	59
Şekil 22. Jel Formülasyonlarının 32 °C'deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği.....	59
Şekil 23. Jel Formülasyonlarının 25 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği.....	60
Şekil 24. Jel Formülasyonlarının 32 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği.....	60
Şekil 25. AO-L Formülasyonuna Ait TPA Grafiği.....	63
Şekil 26. AO-K Formülasyonuna Ait TPA Grafiği	63
Şekil 27. AE-L Formülasyonuna Ait TPA Grafiği	64
Şekil 28. AE-K Formülasyonuna Ait TPA Grafiği.....	64
Şekil 29. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 25 °C'deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği.....	67
Şekil 30. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 32 °C'deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği.....	67
Şekil 31. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 25 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği	68
Şekil 32. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 32 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği	68
Şekil 33. Astaksantin %5 Oleoresin Lipojele Ait % Salım Grafiği	69
Şekil 34. Astaksantin %5 Oleoresin Karbopol Jele Ait % Salım Grafiği	70
Şekil 35. Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Lipojele Ait % Salım Grafiği	70
Şekil 36. Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Karbopol Jele Ait % Salım Grafiği	71
Şekil 37. Serbest radikal süpürme kapasitesi tayini bulguları.....	71
Şekil 38. Total antioksidan kapasite tayini bulguları	72
Şekil 39. Sitotoksosite Bulguları.....	73

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Formülasyonların gram cinsinden terkip tablosu.....	41
Tablo 2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik Bulguları	54
Tablo 3. Tekrar Edilebilirlik Bulguları	55
Tablo 4. Tekrar Elde Edilebilirlik Bulguları.....	55
Tablo 5. Stabilite Bulguları.....	57
Tablo 6. Astaksantin İçeren Alg Ekstresindeki Astaksantin Miktarı Tayinine Ait Bulgular.	58
Tablo 7. Jellerin Genel Özellikleri.....	58
Tablo 8. Jel formülasyonlarına ait G' değerleri	61
Tablo 9. Jel formülasyonlarına ait G'' değerleri.....	61
Tablo 10. Jel formülasyonlarına ait tan δ değerleri.....	62
Tablo 11. Jel formülasyonlarına ait η değerleri	62
Tablo 12. Jellerin Mekanik Özelliklerine Ait Bulgular	65
Tablo 13. Jel Formülasyonlarının etkin madde miktarı tayini	65
Tablo 14. Jel formülasyonlarının pH sonuçları.....	66
Tablo 15. Jel formülasyonlarının 25 °C'deki etkin madde miktarları.....	66
Tablo 16. Jel formülasyonlarının buzdolabındaki (+4 °C) etkin madde miktarları.....	66

GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşlılık; genetik, yaşam şekli, kronik hastalık gibi değişkenleri içeren karışık bir süreçtir. Yaşlanma, ilerleyen zamanla ortaya çıkan karmaşık bir olaydır. İç etkenler ve geçen zamanla oluşan yaşlanmaya “takvimsel yaşlanma” adı verilir. Çevresel etkenler, özellikle ultraviyole ışınları ile ortaya çıkan yaşlanma ise “foto yaşlanma” olarak tanımlanır.

Serbest radikaller, bir atom ya da molekül yörüngesinde eşlenmemiş bir elektron içeren yüksek oranda reaktif kimyasal ürünler olarak adlandırılmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri adı da verilmektedir ve reaktif oksijen türleri oksidatif stres oluşumuna neden olurlar. Son yıllarda yaşlanma ile ilgili araştırmalarda reaktif oksijen türleri üzerinde daha fazla durulmakta ve yaşlanma sürecinde bu radikallerin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Antioksidan maddeler; serbest oksijen türleri ile reaksiyona girip onları etkisiz hale getirirler. Astaksantin de çok güçlü bir antioksidandır. Astaksantin bazı eklem bacaklılar, balıklar ve alglerden elde edilen kırmızı-turuncu renkli, lipofilik bir karotenoid pigmentidir. Astaksantin, antioksidan özellikleriyle bilinen E vitamini ve β -karotenden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında astaksantin içeren topikal bir formülasyona rastlanmamıştır. Astaksantin içeren ve çeşitli amaçlarla kullanılan gıda takviyeleri ve oral formülasyonlar bulunmaktadır.

Çalışmamızda serbest radikal hasarının önlenmesi amacıyla astaksantin içeren jel formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve bu çalışma sonucunda formülasyonların belirlenen sürelerde

ve koşullarda stabilite çalışmaları yapılmıştır. Formülasyonların etkinlik tayinleri için, antioksidan aktivite tayini ve hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Sonuç olarak, hazırlanan astaksantin içeren jel formülasyonları ile güçlü antioksidan aktivite sayesinde deri üzerinde serbest radikal hasarlarının önlenmesi ve yaşlanma karşıtı alanda yenilikçi bir yaklaşım önerilmesi amaçlanmıştır.

I. BÖLÜM

1 GENEL BİLGİLER

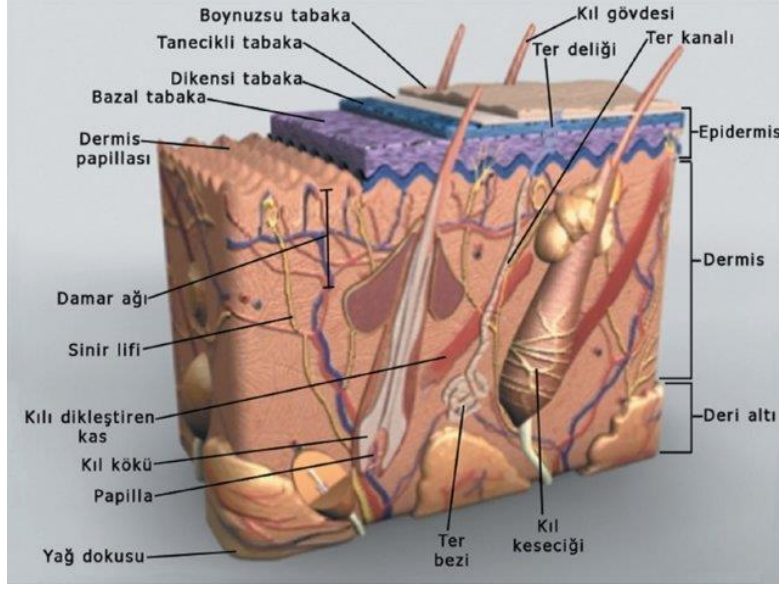
1.1 Deri Hakkında Genel Bilgiler

1.1.1 Derinin Yapısı ve Özellikleri

İnsan derisi, kendine özgü görevleri olan, organizmanın iç düzenini koruyan ve dış ortamla ilişkisini sağlayan vücudun en büyük organıdır ve diğer bütün organ ve sistemler gibi yaşam için vazgeçilmez önemi vardır. Yetişkin bir insanda yaklaşık 2m²'lik bir alan kaplar. Vücudun çeşitli bölgelerinde renk ve kalınlığı değişmektedir. Deri, çıplak gözle de bazı fonksiyonları izlenebildiğinden dolayı, belki de fonksiyonunu en rahat izleyebildiğimiz organdır. Ateş yükselmesinde olduğu gibi iç organlardaki değişiklikleri gösterebilmesinin yanı sıra, güneş maruziyeti, toksinler ve hatta psikolojik stimuluslara da cevap verebilmektedir (67). Vücudumuzu fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere karşı, ultraviyole (UV) radyasyona ve serbest radikallerin tahrip edici etkilerine karşı korur (161).

İnsan derisinin tüm bileşenleri, embriyolojik olarak ektoderm ve mezoderm'den köken almaktadır. Epidermiste; pilosebace birim, ekrin bezler ve tırnak ünitesi ektodermden köken alırken, melanositler, sinirler, özelleşmiş duyu organları neroektoderm'den, Langerhans hücreleri, makrofajlar, Mast hücreleri, fibroblastlar, kan damarları, lenfatik damarlar, kaslar ve yağ hücreleri ise mezoderm kaynaklıdır (164).

Deri üç tabakadan oluşmaktadır: Epidermis, Dermis ve Hipodermis (2) (Şekil 1).



Şekil 1. Derinin Yapısı

1.1.2 Epidermis

Derinin en dış tabakasıdır. Kan damarı ve lenfatik sistem içermez. Kalınlığı bulunduğu bölgeye göre 150-180 µm arasında değişir. Morfolojik görüntü ve hücre fonksiyonlarına göre 5 ayrı tabaka içerir (104).

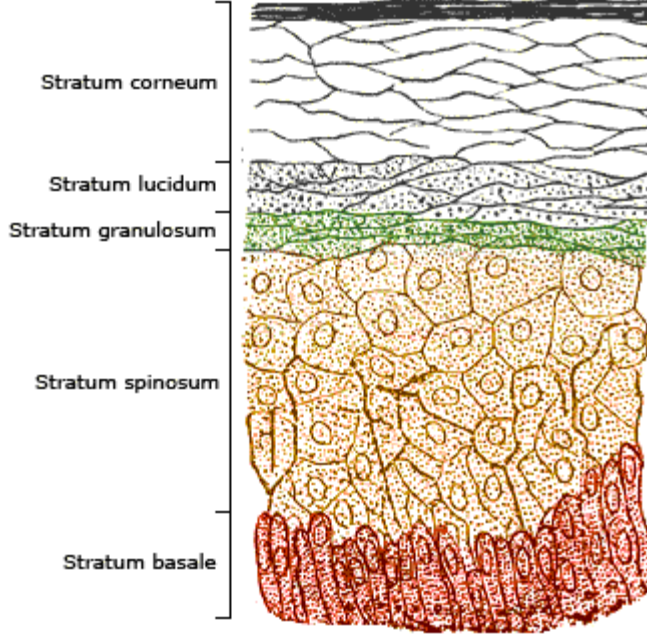
Stratum corneum (Boynuzsu Tabaka)

Stratum lusidum

Stratum granulosum (Granüler Tabaka)

Stratum spinosum (Diken, Sivri Uç Tabakası)

Stratum germinativum (Bazal Tabaka)'dır (Şekil 2).



Şekil 2. Epiderminin Yapısı

Stratum korneum (SC); epiderminin en dış tabakasıdır ve 6-15 μm kalınlığındadır. 15-20 kat ölü, yassılaştırmış, uzamış ve tamamen keratinize olmuş korneositleri içerir. 2 haftada bir kendini yeniler. Yapısı protein ve lipitlerden oluşmaktadır. Protein kısmı α ve β keratinden ibarettir. Lipit kısmı ise; seramitler, serbest steroller, serbest yağ asitleri ve trigliseritler gibi nötral lipitlerden meydana gelmiştir (19,83). SC ilaç moleküllerinin deriden geçişi için ana bariyeri oluşturur. SC tabakası, protein tuğlaları ve lipit harcından meydana gelen düzenli örülmüş bir duvar olarak tanımlanmaktadır. Hücrelerin ve korneositler içindeki proteinlerin etrafını saran lipit tabaka, ilaçların deriden geçişi için bariyer fonksiyonunu üstlenmektedir. İçerdiği lipit miktarı ve cinsi, bulunduğu vücut bölgesine göre değişir ve bu da permeabilitenin farklılığında önemli bir faktördür. Hidrofobik bir membran gibi davranır (11).

Stratum lusidum, kalın deride daha belirgin olup, oldukça yassı eozinofilik hücrelerin oluşturduğu yarı geçirgen ince bir tabakadır. *Stratum granulosum*

tabakasında keratinin büyük bir bölümü ve yapısal proteinlerin üretiminin büyük bir kısmı yapılır. *Stratum spinosum*, tek sıralı hücrelerden oluşmuştur. Fosfolipitler, gliserol ve serbest yağ asitlerine, glikosilseramidler de seramidlere bu tabakada parçalanırlar (34).

En iç tabaka olan *Stratum germinativum*, prizmatik hücreler ve buna komşu olan poligonal hücrelerden oluşur. Bu tabakadaki hücreler metabolitik açıdan aktiftir ve mitozla bölünerek, mevcut oluşmuş hücreleri üst tabakalara itmektedirler (103).

Epidermiste 3 tip özel hücre bulunmaktadır. Bunlar;

1) *Melanositler*; melanin isimli pigment üretimini sağlarlar. Melaninler UV radyasyonu absorplar ve serbest radikal yakalama özelliğine sahiptirler.

2) *Langerhans adacıkları*; ciltte immün sistem için deride bir savunma sağlamaktadır.

3) *Merkel hücreleri*; parmak ucu, el içi ve ayak tabanında daha çok bulunmaları dokunma duyusu (duyu alıcı) ile ilgili olduklarını düşündürür (44,117).

1.1.3 Dermis

Dermisin büyük bölümünü, su tutma kapasitesi yüksek olan polisakkaritler ve proteinler oluşturur. Dermis, 3 önemli protein içeriği ile oldukça zengindir. Bunlar, sağlamlık veren bir protein olan kollajen, retikülin ve esneklik veren bir protein olan elastindir. Dermisin hücresel kısmını da fibroblastlar, mast hücreleri ve histiyositler oluşturur. Dermisin kalınlığı farklı vücut bölgelerinde değişkenlik gösterir. Göz kapaklarında 0.3 mm iken, sırtta kalınlık 3 mm civarındadır. Dermis çok sayıda özelleşmiş hücre ve yapıyı da içerir. Saç folikülleri, ekrin ve apokrin ter bezleri de yer alır. Dokunma ve basınç duyularını ileten özelleşmiş sinir hücreleri de bu tabakadadır. Dermisin ayrıca çok zengin bir damar içeriği vardır (2).

1.1.4 Hipodermis

Bu tabakadaki hücreler fazla miktarda yağ içerir. Yağ hücreleri arasında bulunan kollajen, derinin alt tabakaları ile epidermis ve dermis tabakaları arasındaki bağlantıyı sağlar. Hipodermiste, daha büyük kan damarları ile sinirler bulunur. Adipositler enerji depoları olarak hipodermiste görev yaparlar ve vücut sıcaklığının düzenlenmesinde rol oynarlar (165).

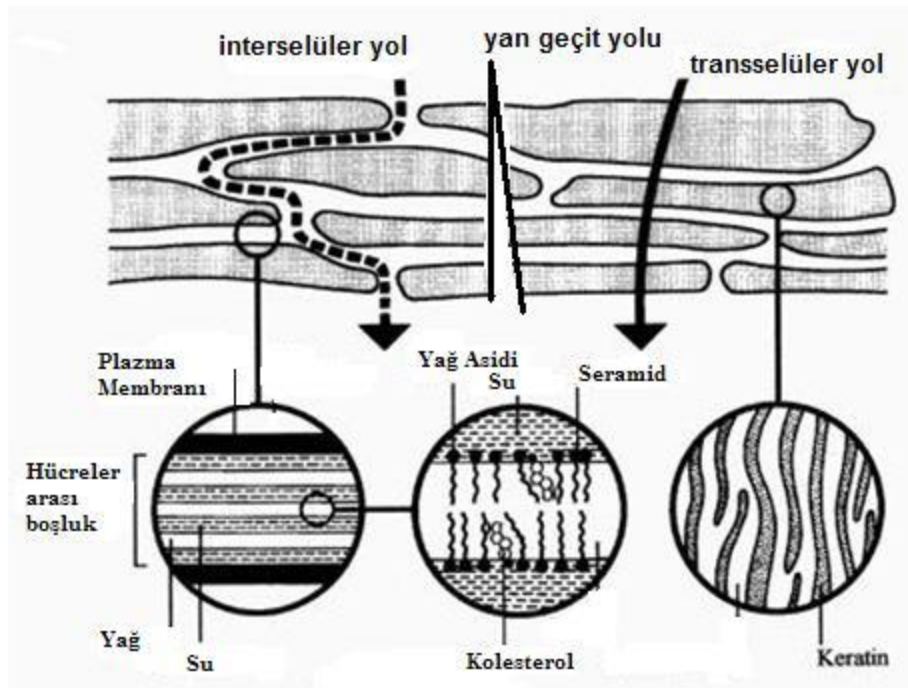
1.1.5 Etkin Maddelerin Deriden Geçiş Yolları

Etkin maddelerin deriden geçişi için üç değişik yol saptanmıştır. Bunlar:

Porlardan ya da boşluklardan geçiş

Hücreleriçi Geçiş (Transselüler Yol)

Hücrelerarası Geçiş (İnterselüler Yol) (Şekil 3).



Şekil 3. Etkin Maddelerin Deriden Geçiş Yolları

1.1.5.1 Porlardan ya da boşluklardan geçiş

Polar yol olarak da bilinen bu yol, kıl folikülü ve ter bezi yoluyla ana bariyeri geçen molekül için düşük dirençli kısa bir yan geçittir. Bu yol, su dolu ter kanallarına girebilen, yüksek derecede suda çözünebilen ve polar maddeler (elektrolitler gibi) için daha önemli bir geçiş yoludur. Son çalışmalar bu yolun ilaçların elektrik akımıyla (iyontoforez) geçişi için önemli olduğunu göstermektedir (82).

1.1.5.2 Hücreleri geçiş (Transselüler yol)

Bu yolda madde, bariyer hücrelerin içinden geçer. Hücreler büyük ölçüde korneositlerden oluşmuştur. Keratin ve keratohyalin bu hücreleri hemen hemen geçirmez yapar. Bu yoldan daha çok polar olmayan maddeler geçebilir (88).

1.1.5.3 Hücrelerarası geçiş (İnterselüler yol)

SC'ü transselüler yolla geçmek için; madde, membrandaki protein ve lipitlerle etkileşir. Eğer interselüler yol baskın ise, madde ile korneositler arasındaki lipit tabakaların içinden bile geçebilir. Oktanol / su dağılım katsayısına dayalı çalışmalar, interselüler yolun penetrasyonun ana yolu olduğunu desteklemektedir (32,127).

Genel olarak, SC'dan geçiş esas olarak geçen molekülün oktanol / su partision katsayısından ve molekül ağırlığından tahmin edilebilir (3).

1.1.6 Deriden Geçiş Etkileyen Faktörler

Deriden ilaç absorpsiyon hızını etkileyen faktörler, kişiye ait biyolojik ve ilaca ait fizikokimyasal faktörler olarak iki ana gruba ayrılırlar (10).

1.1.6.1 Biyolojik Faktörler

❖ **Derinin Yaşı:** Deri yaşı ile deri geçirgenliği arasındaki ilişki çok net açıklanmasa da, yaşlanmaya bağlı olarak deri korneositlerindeki kalınlaşmanın arttığı, deri yenilenme hızının azaldığı ve deri uzantılarının yapı ve fonksiyonlarındaki farklılıklara bağlı olarak deri geçirgenliğinin azaldığı

düşünölmektedir. 40 yaşın üzerinde deri nem içeriğinin azalmasına bağılı deri geçirgenliğinin azaldığı gösterilmiştir (124).

❖ **Derinin Durumu:** Derinin bariyer fonksiyonunu sürdürebilmesi için bütönlüğünün bozulmamış olması gerekir. Asit, alkali ve değışik kimyasal maddelerin etkisi, deri üzerinde kesi, yara ve dermatit gibi durumlarda deri bütönlüğünün bozulmasına bağılı olarak deri geçirgenliği artar (10).

❖ **Bölgesel Farklılıklar:** SC kalınlığı, vücudun çeşitli bölgeleri arasında farklılık gösterdiğinden, geçirgenlik de bölgeden bölgeye değışkenlik gösterecektir. Etkin maddelerin geçirgenliği, farklı bölgelerdeki SC'un kalınlığına, yapısına ve kıl foliküllerinin bulunup bulunmamasına bağılıdır. Sıçan derisi ile yapılan bir çalışmaya göre, karın derisinin, sırt derisine göre, geçirgenliği daha fazladır (10).

❖ **Derinin Hidratasyonu:** SC tabakasının hidratasyonu, birçok molekülün deriden geçiş hızını etkileyen önemli faktörlerden birisidir. Derinin üzerinin örtülmesi veya uygulanan formülasyondaki sıvağın örtücü etkisiyle terlemesi ve suyun epidermisin alt tabakalarından, üst tabakalarına doğru difüze olması sonucunda, SC tabakasının hidratasyonu artmaktadır (21,69,142).

❖ **Sıcaklık:** Deride sıcaklık artışı ile etkin maddelerin deriden geçiş hızı artmaktadır. Etkin maddelerin deriden penetrasyonunda sıcaklık, daha çok derinin hidratasyonu ile birlikte etkili olmaktadır (140).

❖ **Kan Dolaşımı:** İn vivo kan akım hızı, etkin maddelerin deriden emilimini etkilemektedir. Dermisteki kan akımının artması, penetre olan ilacın dermiste kalış süresini azaltır ve lokal etkili ilaçlar için istenmeyen bir durumdur. Nikotinik asit ve türevleri deride kan akımını artıran maddelerin basında gelir. Steroitler ise vazokonstrüksiyona bağılı kan akımını yavaşlatır (10).

❖ **Tür Farklılıkları:** İnsan ve hayvan derisi, SC'un kalınlığı, birim yüzey alandaki kıl folikülleri ve ter bezlerinin sayısı açısından büyük farklılık gösterir. Deriden etkin madde geçişi çalışmalarında, genellikle tavşan, sıçan, domuz ve fare derisi kullanılmaktadır. İnsan derisine göre, daha fazla kıl folikülü içermeleri ve ter bezlerinin bulunmamasına rağmen, insan derisinin temin edilmesindeki zorluklar nedeniyle, sıçan derisi penetrasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında yapılan çalışmalar göstermiştir ki, domuz kulak derisi, insan derisine histolojik açıdan en çok benzeyen deridir. Bu yüzden topikal ilaç taşıyıcı sistemlerde, domuz kulak derisi sıklıkla kullanılmaktadır (15,50,73).

❖ **İrk Farklılıkları:** Aynı cinse ait farklı ırklar arasında da deriden etkin madde geçişinde farklılıklar görülmektedir. Siyah ve beyaz ırkın SC'unun yapısı incelendiğinde, zencilerde melanin miktarının yüksek olması nedeni ile zenci derisinin permeabilitesi daha düşük bulunmuştur (16).

1.1.6.2 Fizikokimyasal Faktörler

❖ **Etkin maddenin çözünürlüğü ve moleküler özellikleri:** Etkin maddelerin deriden difüzyon hızı, etkin madde konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Pasif difüzyon ile gerçekleşen bu durum I. Fick Yasası ile ifade edilmektedir. Etkin maddenin konsantrasyonunun artması, etkin maddenin termodinamik aktivitesini de artırmaktadır ve böylelikle etkin maddenin deriden geçen miktarında artış olur (131).

Etkin maddelerin molekül büyüklüğü ve molekül ağırlığı ile deriden penetrasyonu arasında ters orantı vardır. Küçük moleküllü bileşikler, büyük moleküllere oranla daha hızlı penetre olurlar. Molekül ağırlığının artmasıyla etkin maddelerin difüzyon katsayısı ve deriden geçişleri azalır. Yapılan çalışmalarda, protein/peptitlerin penetrasyonu yüksek molekül ağırlığına sahip olmalarından dolayı

çok düşük bulunmuştur. İlacın deriden penetrasyonu için, etkin maddenin optimal molekül ağırlığı 500 daltondan küçük olmalıdır (86,147).

❖ **Etkin madde-Deri etkileşimi:** İlaç moleküllerinin deriden geçişini etkileyen önemli faktörlerden biri, etkin maddenin yağ/su dağılım katsayısıdır. 'Meyer-Overton Teorisi' ne göre, yağda çözünen moleküller hücre zarını kolaylıkla geçerler, suda çözünen moleküller ise, hücre içindeki proteinlerin hidrasyonuna bağlı olarak deriden penetre olabilirler. Yüksek permeabilite için, yağ/su dağılım katsayısının 1 ile 3 arasında olması istenir (86).

❖ **Sıvı-Deri etkileşimi:** Topikal ilaç formülasyonunda kullanılan sıvı, derinin lipit tabakası ile etkin maddenin temasını sağlayarak veya SC tabakasının hidrasyonu için örtücü bir etki oluşturarak deriden penetrasyonu arttırabilir. Formülasyonda kullanılan sıvının, toksik ve iritan olmayan, alerji yapmayan, tatsız, kokusuz, renksiz, kimyasal olarak inert ve ucuz olması istenir.

❖ **Etkin madde-Sıvı Etkileşimi:** Formülasyonda kullanılan sıvının etkin maddenin termodinamik aktivitesini sıvı içinde yüksek tutabilmesi istenir. Bir çalışmada farklı sıvılardan tiapronik asitin penetrasyonu araştırılmış ve Karbopol 940 en uygun sıvı olarak bulunmuştur (116).

1.2 Yaşlanma Hakkında Genel Bilgiler

1.2.1 Yaşlanma

Yaşlanma, insan organizmasında tüm yaşam boyunca gözlenen değişiklikleri kapsayan karmaşık bir işlemdir. Yaşlanma hızı, türler arasında farklılık göstermekle birlikte, genellikle, aynı türe ait bireyler arasında tekdüzelik göstermektedir. Bu durum, yaşlanma olayının, genetik bir program altında gerçekleştiğini düşündürmektedir. Alternatif olarak, yaşlanma işlemi, genler veya proteinler düzeyinde düzen kaybına yol açacak kümülatif hasar sonucu da meydana gelebilir.

Yaşlanma, ilerleyen zamanla ortaya çıkan karmaşık bir olaydır. İç etkenler ve geçen zamanla oluşan yaşlanmaya “takvimsel yaşlanma” adı verilir. Çevresel etkenler, özellikle ultraviyole ışınları ile ortaya çıkan yaşlanma ise, “foto yaşlanma” olarak tanımlanır (115).

1.2.2 Serbest Radikal Teorisi

Yaşlanmayı açıklamaya çalışan fizyolojik mekanizmalar genellikle teori seviyesindedir ve bunlardan hiçbiri yaşlanmanın mekanizmasını açıklamaya yeterli değildir (8,35). Bu teoriler arasında günümüzde en çok destek göreni serbest radikal teorisi dir. Son yıllarda doğa kirliliği, stres ve hazır gıdaların yaygın olarak tüketiminin insan vücudunda serbest radikallerin oluşumunu arttırdığı düşünülmektedir (125,126). Oksidan bileşiklerin artması sonucu gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalarla biyomoleküllere zarar vermektedir (8,30,72). Lipit, protein, karbonhidrat ve DNA üzerinde meydana gelen hasar ve birikim sonucunda yaşlanma belirtileri ortaya çıkmaktadır (29).

Serbest radikal teorisine göre yaşlanma, oksijenli solunum sırasında oluşan serbest radikallerin dokularda birikmesi sonucu oluşan hasarlar nedeniyle olmaktadır. Denham Harman’ın öne sürdüğü bu teori kapsamında serbest radikalleri Pandora’nın “Felaketler kutusuna” benzeterek, biyolojik oksidasyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin ömür boyunca rastgele ve birikimsel hücre hasarı oluşturarak, doku ve organ yaşlanmasına yol açtığını bildirmiş, radikallerin büyük çaplı hücre hasar, mutagenез, kanser ve yaşlanmanın dejeneratif sürecinden sorumlu olabileceği görüşünü öne sürmüştür (56).

1.2.3 Yaşlanma Karşıtı Alanda Topikal Olarak Kullanılan Ajanlar

Bunlar;

1. Retinoidler
2. Antioksidanlar
3. Nemlendirici ve deri bakım ürünleri
 - Oklüzif yağlar
 - Nem çekiciler
 - Bitkiler, bitkisel ekstraktlar
 - Hayvansal ekstraktlar
 - Biyolojik faktörler
 - Deri lipitleri
4. Alfa hidroksi asitler
5. Güneşten koruyucular
6. Peptid proteinler.

1.3 Serbest Radikaller (Oksidanlar) ve Antioksidanlar Hakkında Genel Bilgiler

1.3.1 Serbest Radikaller (Oksidanlar)

Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları çiftlenmiş halde bulunur. Eğer elektron çiftlenmemiş ise molekül daha reaktif ve kararsız duruma geçer. Bir ya da daha fazla sayıda çiftlenmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere “serbest radikaller” denir. Serbest radikallerdeki çiftlenmemiş elektronlar kararlı duruma geçmek ister ve kararlı halde bulunan bir bileşikten elektron alarak, bu bileşiği yeni bir serbest radikal haline dönüştürür. Serbest radikallerin başlattığı bu zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder. Oksidasyon olayı aslında hayatın her evresinde yaşamakta olduğumuz doğal bir süreçtir. Günlük hayatımızda, örneğin

kabuğu soyulan bir elmanın bir süre sonra kahverengileşmesi oksidasyon olayına bir örnek olarak verilebilir.

Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir molekül olmasına rağmen aynı zamanda vücut içinde reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyonu başlatır ve bunlar canlı için aynı zamanda bir tehdit unsuru haline gelir.

Organizmada serbest radikaller; gerek normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak; gerekse radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasalların etkisi ile oluşur. Metabolizma yan ürünleri olarak; süperoksit anyonları (O_2^- , $O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi mutajenler meydana gelir. Ayrıca NADPH oksidaz gibi bazı enzimler küçük miktarlarda Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretir. Hücre içi ROS'un % 90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondriumun iç membranında üretilir (163).

1.3.2 Oksidatif Stres

Vücudumuzda oksidanlar ile antioksidanlar arasında bir denge vardır. Bu dengenin bozulması oksidatif stres adı verilen bir durumun meydana çıkmasına neden olur (52,92). Oksidatif stres, organizmada hücre ölümüne (apoptoz) dahi sebebiyet verebilecek çok ciddi sonuçlar doğurur. İki tarafı keskin bir bıçak gibi kabul edilen reaktif oksijen türleri, düşük dozlarda çeşitli stres tepkilerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda (oksidatif stres gibi) hücrel zararlar açar (98). Oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünleri DNA, proteinler ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücrenin ölümüne neden olarak kronik hastalıkları başlatır (70).

1.3.3 Antioksidanlar

Serbest radikallerin ve oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı organizmayı koruyan bileşiklere *antioksidanlar* adı verilir.

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler. Bunlar:

1. Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi: Antioksidanların oksidanlara bir hidrojen aktararak onları inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobın, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
4. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar (144).

Antioksidanlar, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki ana gruba ayrılırlar. Polifenoller enzimatik olmayan antioksidanlar arasında, en geniş yer kaplayan antioksidanlardır ve kaynağı bitkilerdir (40,65,89,160). Meyve ve sebzelerde bulunan doğal antioksidanlar, insan sağlığına pek çok yararlı etkilerinden dolayı bilim dünyasının ilgisini çekmektedir. Son yıllarda; meyvelerin, sebzelerin, baharatların, tıbbi bitkilerin ve mikroalglerin total fenolik madde içerikleri ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalara ilgi artmaktadır (45,79).

1.3.3.1 Enzimatik Antioksidanlar

1.3.3.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit serbest radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştüren bir enzimdir (102,157). Süperoksit dismutaz, doğada bilinen en etkin

antioksidanlardır. Ökaryotik ve prokaryotik organizmaların doğasında yaygın bir şekilde bulunur (101).

1.3.3.1.2 Katalaz

Doğada bulunan en önemli antioksidanlardandır. Yapısında Fe^{+3} bulunduran dört hem grubundan oluşmuş hemoproteindir (102).

1.3.3.1.3 Glutasyon Peroksidaz

Selenyum kofaktör olarak kullanan bir enzimdir (45). Hidrojen peroksit ve lipithidro peroksidi metabolize eder. Çoğu insan dokusunda bulunur (102).

1.3.3.1.4 Glutasyon Redüktaz

Metabolik faaliyetler sonucunda yükseltgenen glutasyonu, tekrar indirgenmiş şekline dönüştüren enzimdir (139).

1.3.3.1.5 Glutasyon S – Transferaz

Toksik metabolitler ile glutasyonun konjugasyonunu sağlayan enzimdir (102,157). Böylelikle organizmayı detoksifiye eder (7).

1.3.3.2 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1.3.3.2.1 C Vitamini

Çok önemli ve çok güçlü antioksidan özelliğe sahiptir (157). Askorbik asit olarak da bilinir. Kollajen sentezi gibi pek çok gerekli metabolik faaliyetlerde rol alır. Hücre membranlarını oksidasyondan koruyarak onların hasara uğramasını engellediği, günümüzde oldukça iyi anlaşılmış bir gerçektir. Son çalışmalar; askorbik asitin plazma düzeylerindeki artışın, redoks aktif demir veya bakır ve hidrojen peroksit varlığında dahi, lipid peroksidasyonuna karşı doza bağımlı direncin arttığını göstermektedir. Pek çok in vivo çalışma, C vitamini takviyesinden sonra oksidatif DNA, protein ve lipid hasarını gösteren işaretçilerin azaldığını göstermektedir (157). Askorbik asit; suda çözünen peroksil radikallerini, singlet oksijeni, superoksit

radikallerini ve nitroksit radikallerini süpürerek onların zararlı etkilerini ortadan kaldırır. Aktif nötrofiller sayesinde oluşan peroksidasyondan plazma lipitlerini korur (53).

Vitamin C, UV'ye bağlı serbest radikalleri giderebildiği ve diğer potent antioksidan olan vitamin E rejenerasyonu sağladığından kozmetik bileşik olarak ilgi çekmektedir. Vitamin C, kollajen üretimini uyardığı için yaşlanma karşıtı ürün olarak da düşünülmektedir. Kozmetiklerde 3 formu kullanılmaktadır; askorbil palmitat, magnezyum askorbil fosfat ve L-askorbik asit. Antioksidan olup kollajen sentezinde rol oynar. Pigmentasyonu önleme özelliği vardır. Renk açıcı olarak da kullanılır (96).

Ürün stabilitesindeki zorluk, deriye topikal penetrasyonundaki güçlükler rağmen, deri bakım ürünlerinin çoğu vitamin C içerir. Kozmetik ürünlerde en çok bulunan vitamin C formu, L-askorbik asit ve onun ester formu askorbil palmitattır. Son yıllarda, askorbik asidin stabil ve hidrofobik, düşük pH'da noniyonize moleküler formları geliştirilmiştir (25).

1.3.3.2.2 E Vitamini

Yağda çözünen bir vitamindir. Sekiz farklı çeşidi vardır. α – tokoferol bilinen en aktif türüdür. Vücudumuz için güçlü antioksidan özelliğe sahiptir. Yağda çözündükleri için selluler ve subselluler membranlar ile lipoproteinlerde bulunurlar. Membranlarda oksijen radikallerinin en önemli temizleyicilerindendir. Doymamış yağ asitleri serbest radikallerin saldırılarına karşı oldukça duyarlıdır. Lipit peroksidasyonu sırasında, peroksil ve alkoksil radikalleri oluşur. Bunlar, E vitamini varlığında yağ asitleri yerine α – tokoferol ile birleşir. Böylelikle zincir reaksiyon kırılmış olur. Bu reaksiyon sonucunda membranlarda ve lipoproteinlerde α – tokoferol radikalleri oluşur. Bu radikallerin başka bir yağ asidiyle birleşebilme

aktivitesi düşüktür. C vitamini, bu radikallerin tekrar E vitaminine dönüşmesinde önemli bir rol oynar (53,102,157).

Vitamin E, yumuşaklığı ve cildin pürüzsüzlüğünü arttırdığı için mükemmel bir nemlendiricidir. Fotokoruma ve antikarsinojenik etkileri de vardır. Topikal vitamin E'nin fotokoruma etkili olduğunu tespit eden birçok çalışma bulunmaktadır. Gerçekte, vitamin E tüm insan derisinde herhangi bir fotokoruma sağlayabilmesi için diğer vitamin C, selenyum veya tiyoller gibi antioksidanlarla kombinasyonu gerekir ve bunlar tokoferol degradasyonunu önler (87).

Yapılan bir çalışmada vitamin E'nin %2'lik lipojel (zeytinyağı içinde) ve hidrojel formülasyonları geliştirilerek yaşlanma karşıtı alanda kullanılabilecekleri belirtilmiştir. Hidrojel formülasyonunun güneş banyosu sonrası antioksidan fonksiyonlarıyla kullanışlı olabileceği, lipojel formülasyonlarının deride uzun süre kalabilmesinden dolayı da fotohasarlı ve normal yaşlı deride antioksidan özellikleriyle kullanılabileceği önerilmiştir (46).

Topikal vitamin E uygulaması, kontakt ürtiker, ekzematöz dermatit, eritema multiforme benzeri reaksiyon gibi uygulama yerinde reaksiyonlara yol açabilir. Kontakt dermatit %20-33 oranında gözlenebilmektedir (87).

1.3.3.2.3 Karotenoidler

Mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan pigment yapılarıdır. Karotenoidler bitkilere sarı, kırmızı ve turuncu rengi verir. Doğada 600'ün üzerinde karotenoid vardır. Güçlü antioksidan etkinliği olan karotenoidlerin en önemlileri; β -karoten, astaksantin, lutein, likopen, zeaksantin, kantaksantindir. Çeşitli çalışmalar, karotenoidlerin bazı kanser türlerini, ateroskleroz ve yaşlanmaya bağlı muskular dejenerasyonu engellediğini göstermiştir. Karotenoidler, konjuge çift bağ yapısının ortaklanmamış elektronlar üzerindeki yetenekleri sayesinde antioksidan özellik

kazanmıştır (157). Yağda çözünürler. Bu moleküller bitkide sentezlenebilirken hayvanlarda sentezlenemezler. Kloroplast ve kromoplast gibi organellerde bulunurlar. Bitkilerin görülebilen renkleri, karotenoidlerin yapısında bulunan konjuge çift bağların ışığı absorbe etmeleri sayesinde oluşur (75). Yüksek konsantrasyonda, lipitleri peroksidatif hasardan korur. Genel olarak karotenoidlerin serbest oksijen radikalleri ile etkileşmeleri üç mekanizmayla olur (157).

- a. Radikal katımı ile
- b. Karotenoidlerden hidrojen çıkması ile
- c. Elektron transfer reaksiyonları ile.

En önemli karotenoidlerden bir tanesi β – karotendir. Vitamin A öncüsü yapılarıdır. Bisiklik β – karoten, yiyeceklerde en yaygın olarak bulunan karotenoiddir (33).

1.3.3.2.4. Glutatyon

Tripeptid yapısında, multifonksiyonel intraseluler enzim olmayan bir antioksidandır. Hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunur. Suda çözünür. Başta hücrede sitozolde ve diğer yaşamsal sistemlerin sulu fazlarında bulunur. Organizmada, indirgenmiş hali ve yükseltgenmiş hali olarak iki çeşidi bulunur. Glutatyonun indirgenmiş hali; çekirdekte, DNA'nın eşleşmesi ve tamiri için önemli olan protein sulfidrillerin redoks halini devam ettirir (76,157).

1.3.3.2.5 Polifenoller

Enzimatik olmayan antioksidanların pek çoğu yiyecekler ile vücuda sağlanır. Bu sınıf antioksidanların içinde en geniş yer tutanı ise polifenollerdir. Polifenoller; flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere iki sınıfa ayrılır (55,157). Flavonoidler, 4000'den fazla polifenolik bileşik içeren, doğal yollar ile oluşan bitkisel merkezli moleküllerdir. Ortak olarak fenilbenzopiron yapısı (C6 – C3 – C6) içerirler. Merkezi

piran halkasının açılımına ve doyunluk seviyelerine göre kategorize edilir. Başlıca; flavonlar, flavanoller, izoflavonlar, flavonoller, flavanonlar ve flavanonoller olarak gruplandırılırlar. İn vitro hücre kültüründe veya hücreden bağımsız sistemlerde; superoksit anyon, singlet oksijen ve lipit peroksil radikallerini süpürme etkisi gösterirler (133).

1.3.3.2.6 Koenzim Q10

Koenzim Q10, lipit peroksidasyonunu engeller. Mitokondride oluşan oksidatif stresi azaltır. Koenzim Q10 poliizopren zincirine sahiptir. Bu zincir on izopren biriminden oluşmuştur (28).

Topikal Koenzim Q10 uygulanması, ekstrinsik yaşlanmada UV hasarını antioksidan fonksiyonla azaltıp, kronolojik yaşlanmayla kaybolan antioksidanı azalmış olan endojen seviyelerini yerine koyarak takviye yapabilir (25). Topikal Koenzim Q10 kullanımının şimdiye kadar yan etkisi gösterilmemiştir. Bu ürünler iyi nemlendiriciler olarak formüle edilmektedir. Araştırmacılar kültüre hücrelerde UV ışınına karşı antioksidan olup epidermis ve dermise penetre olabileceğini göstermiştir. Bu etkisi son yıllarda kozmetiklere katılmasını hızlandırmıştır. İnsan derisinde topikal uygulamasının antioksidan etkinliği konusunda yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (25,87).

1.3.3.2.7 Selenyum

Mineral antioksidanlardandır. İnsan sağlığı için temel bir öneme sahiptir. Selenyum toprakta bulunur ve beslenme zincirine bitkiler sayesinde girer. Glutatyon peroksidaz enziminin yapısına girerek antioksidan etkiye katkıda bulunur (18).

1.4 Jeller Hakkında Genel Bilgiler

1.4.1 Jel Tanımı

Jel oluşturan bir madde ve yüksek oranda çözücü içeren, şeffaf ya da opak görünümlü yarı katı preparatlardır (120). USP (Amerikan Farmakopesi)'de jeller, organik büyük moleküllerin sıvı fazda tamamen çözüldüğü veya inorganik küçük moleküllerin süspande halde bulunduğu yarı katı preparatlar olarak tarif edilirken, BP (İngiliz Farmakopesi)'de homojen, deriye veya bazı mukoz membranlara uygulanan preparatlar olarak tanımlanmaktadır (17,150).

1.4.2. Jellerin Sınıflandırılması

Jeller, genellikle tek veya iki fazlı sistemler olarak sınıflandırılırlar (132).

1.4.2.1 Tek fazlı sistemler

Tek fazlı sistemler, sıvı fazda tamamen çözülmüş organik moleküller ile hazırlanan sistemlerdir. Sentetik makromoleküller (karbomerler gibi) veya doğal zamklar (kitre zankı gibi) içeren jeller tek fazlı sistemlerdir. Doğal zamklar ile hazırlanan tek fazlı jellere müsilaj denir (132). Bu sistemlerde organik moleküller çözücü içinde düzensiz esnek zincirler şeklinde bulunurlar. Uygulama, kullanım ve temizleme kolaylığından dolayı, ilaç ve kozmetiklerde çok kullanılırlar (132,171). Tek fazlı sistemlerde çözücü olarak çoğunlukla su kullanılmasına rağmen, alkol ve mineral yağ da kullanılmaktadır (132). Su kullanılarak hazırlanan jellere hidrojel; alkol ya da mineral yağ içerenlere ise organojel denir (24).

1.4.2.2 İki fazlı sistemler

İki fazlı sistemler, inorganik küçük moleküllerin sıvı faz içinde üç boyutlu dayanıksız bir ağ yapısı oluşturduğu sistemlerdir. İnorganik moleküller çözünmedikleri için sıvı içinde dağılmış halde bulunurlar (171). Bu sistemlere alüminyum hidroksit jeli örnek verilebilir. İki fazlı sistemlerde dağılan fazın partikül

1.4.4 Jellerin Hazırlanmasında Kullanılan Polimerler

Jellerin hazırlanmasında çok çeşitli polimerler kullanılmaktadır. İlaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılan jel yapıcı maddelerin aşağıdaki özelliklere sahip olması istenir (48,171).

- ❖ İnert ve saf olmalıdır.
- ❖ Formülasyonda yer alan etkin madde ve yardımcı maddelerle geçimli olmalıdır.
- ❖ Düşük konsantrasyonda kullanılmalıdır.
- ❖ Ekonomik açıdan uygun ve kolay temin edilebilir olmalıdır.
- ❖ Kullanılışı ve depolama esnasında sıcaklık ile reolojik özellikleri fazla değişmemelidir.
- ❖ Kozmetik ve estetik açıdan kabul edilebilir olmalıdır.

1.4.4.1 Doğal Polimerler

1.4.4.1.1 Proteinler

Kollajen ve jelatin, proteinik yapılu jel polimerlerine örnektir. Kollajen, % 0,1-0,3 oranlarında bile jel oluşturma kapasitesine sahip hayvansal bir kopolimerdir (109,138). Jelatin ise hayvansal kollajenin asit (Jelatin A) ya da alkali (Jelatin B) ile hidroliziyle elde edilen ve % 50'ye varan oranlarda kullanılabilen bir polimerdir (77,169).

1.4.4.1.2 Polisakkaritler

Kitozan, kabuklu hayvanlarda ve böceklerde bulunan kitinden elde edilir. Düşük pH'larda jel oluşturur (94,114). Deniz ürünlerinden elde edilen agar % 0,1 gibi düşük bir oranda bile jel oluşturabilen bir polimerdir (31,143). Agar gibi deniz ürünlerinden elde edilen aljinatların sodyum ile oluşturduğu tuzu suda çözünen jeller oluştururken, kalsiyum tuzu suda çözünmeyen jeller meydana getirir (78,84,134).

Glisirizin, arap zımkı ve kitre zımkı da polisakkarit yapılı jel polimerlerine örnek olarak verilebilirler (39).

1.4.4.2 Yarısentetik Polimerler

Sodyum karboksi metil selüloz, hidroksi propil metil selüloz, metil selüloz, hidroksi propil selüloz, hidroksi etil selüloz gibi selüloz türevleri bu grupta yer alır (1,66,148).

1.4.4.3 Sentetik Polimerler

Karbopol, akrilik asitin yüksek molekül ağırlıklı sentetik polimeridir. Jelleştirici ajan olarak % 0,5-2 oranlarında kullanılır (80,121). Polivinil alkol (PVA) % 10- 15 oranlarında jel oluştururlar (85,110,**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**). Poloksamer % 15- 20 oranında jel oluşturur (129,**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**). Poliakrilamit % 4- 10 oranlarında jel oluşturur (27,93).

1.4.4.3.1 Karbopol

Karbopol oldukça yüksek molekül ağırlıklı akrilik asit polimeridir. Karbopol sulu ortamda süspande olabilen, inceltici ve stabil bir polimerdir. Uzun yıllardır farmasötik ve kozmetik alanında kullanılmaktadır. Birçok ilaç için uygun bir taşıyıcıdır (37,64). Karbopol jeller kitozan gibi doğal kaynaklı hidrojellere göre daha dayanıklı ve stabil oldukları için oldukça sık kullanılırlar. Bunun yanı sıra doğal kaynaklı polimerlere göre biyolojik kabul edilebilirliği daha azdır (74).

1.4.4.3.2 Kitozan

Kitinin deasetilasyonu ile oluşan sentetik bir polimerdir. Asetilasyon derecesi ve moleküller ağırlığı kitozanın fizikokimyasal özelliklerini belirlemektedir (146). Kitozan, asetik asit gibi zayıf asitlerde znr fakat organik zclerde znmez. Bu nedenle jel hazırlanması esnasında ortama asit ilavesi yapılır (59). Kitozan,

farmasötik formülasyonlarda güvenle kullanılmaktadır. Çeşitli ilaçlar ve farklı uygulama yolları için kullanılan kitozan jelleri mevcuttur (71).

1.4.4.3.3 Poloksamer

Poloksamer, inhalasyon, oral çözeltiler, süspansiyonlar, oftalmik preparatlar ve topikal formülasyonlarda yer alan bir yardımcı maddedir (41,136). Poloksamer 407, polioksietilen ve polioksipropilenden oluşan bir kopolimerdir. Bu polimer ile sıcaklık etkisiyle geri dönüşümlü olarak jelleşen sistemler oluşturulabilmektedir (12,74). Sistem uygulama öncesinde sıvı haldeyken fizyolojik ortamda ısı etkisiyle jelleşmektedir. Bu durum uygulama kolaylığı sağlamaktadır.

1.4.5 Hidrojeller

Polimerik jellerin en önemli özellikleri şişme ve elastisite özellikleridir. Gerek şişme, gerekse elastisite özelliği, jellerin çapraz bağlı yapıda olmasından kaynaklanır ve jelin yapısına ve bulunduğu ortama göre değişim gösterir. Hidrojellerin su absorblama içeriği, kendi kütlelerinin %100 kadarı veya daha fazlası ise, bu hidrojellere süper şişebilen hidrojeller denir. Kendilerini çevreleyen dış şartlara bağlı olarak bir jel, termodinamik dengeye ulaşıncaya kadar, çözücü absorblayarak şişer veya çözücüyü iterek büzülür ve polimerik ağ ve çözücüye bağlı olarak hacim-faz geçişi yapabilir. Jellerin dışında, başka bir katı bu özelliğe sahip değildir. Dış uyarıcılardan birindeki küçük bir değişim, jel hacminde çok büyük değişimlere neden olur. Yani jel, yüksek oranda şişer veya büzülür. Bu olaya *hacim faz geçişi* denilir. Jellerin şişebilme kabiliyeti; başlangıç monomer konsantrasyonu, çapraz bağlayıcı konsantrasyonu, jeldeki iyonik grupların sayısı ve polimer ile çözücü arasındaki etkileşime bağlı olarak değişmektedir (57,135,172).

Jel yapıları kimyasal ve fiziksel olarak ikiye ayrılır. Kimyasal jellerde, zincirler kuvvetli kimyasal bağlarla bağlanmış iken; fiziksel jellerde, zincirler arası

bağlar fiziksel kuvvetlerle oluşur. Sıcaklık ya da çözücünün değişmesiyle kimyasal jellerde bir yapısal değişiklik olmamasına karşın, fiziksel jeller bu etkilerle homojen bir çözelti oluşturur ve başlangıç koşullarına döndüğünde, yeniden jelleşir.

Hidrojellerin üç boyutlu yapısı; kimyasal bağlar ya da iyonik etkileşim, hidrojen bağı, fiziksel etkileşimler, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler gibi kohezyon kuvvetleri aracılığıyla gerçekleşir. Hidrofobik etkileşimler, fiziksel çapraz bağ benzeri etkileşimler olduğundan, jelin şişme davranışını doğrudan etkilemektedir. İyonik yüklerine göre; nötral (yüksüz), anyonik (negatif yüklü), katyonik (pozitif yüklü) ve amfolitik (her iki yüke de sahip) hidrojellerden söz edilebilir. Fiziksel yapılarına göre ise, amorf, yarı kristal ve hidrojen-bağlı yapılar olarak sınıflandırılırlar (16,90). Asidik bir hidrojel yüksek pH'larda iyonize olurken, düşük pH değerlerinde iyonize olmaz. Bu nedenle, yüksek pH'larda şişme derecesi artar. Ağ yapıdaki yük yoğunluğu, yani iyonlaşabilen monomer konsantrasyonu da, jellerin şişmesini arttıran faktörlerden biridir. Jel içindeki yüksek iyon konsantrasyonu, osmotik etki nedeniyle suyun jel içine akışını, yani jelin şişmesini arttırır. Hidrojeller, bunun yanı sıra dış ortam koşullarına göre (pH, sıcaklık, iyonik güç ve elektromanyetik radyasyon) çevre duyarlı hidrojeller adı altında da sınıflandırılabilirler. Bu jeller, çevresel uyarılara cevap verdikleri için akıllı jeller olarak da bilinir (128).

1.4.6 Organojeller

Organojeller, organik çözücü ile jel yapıcı maddeden oluşmuş yarı katı sistemlerdir (24,106). Organojeller, düşük konsantrasyonlarda, jel yapıcı madde moleküllerinin kendiliğinden birleşmesiyle oluşmakta ve bir araya gelen moleküller birbirine dolaşan genellikle uzun lifler halinde süper yapılar meydana getirmektedirler. Bu şekilde, sıvı büyük ölçüde hareketsiz hale gelmekte ve değişken

kıvamda bir jel oluşmaktadır (119,149). Sıvı yapılarına rağmen katıların dış görünüşlerini ve reolojik özelliklerini gösterirler. Bu sistemler kolloidal yapıya sahiptirler (81,166). Hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçların hapsedilmesinde kullanılabilirler. Etkin madde içeren organojeller etkin maddelerin sadece lokal etki göstermesini sağlamayıp ayrıca, penetrasyon arttırıcıların varlığında lipofilik özellikleri ve örtücü etkileri etkin hale getirildiği zaman transdermal absorpsiyon yoluyla sistemik etki de göstermelerini sağlayabilirler (137,166). Lesitin, sorbitan monostearat ve polisorbattar gibi iyonik olmayan yüzey etkin maddeler ters miseller şeklinde birleşme eğilimindedirler. Organik çözücü içindeki bu yüzey etkin maddeler, su eklenmesi ile jel oluşturmak üzere birleşerek, yeniden yapılanmaya girerler. Yeni jel yapıcı maddelerin sentezlenmesi ile organojellerin çeşitli alanlardaki uygulanabilirliği araştırılmıştır (4).

1.4.7 Jellerin Reolojik Ve Mekanik Özellikleri

Reoloji, dış kuvvetler etkisi ile maddelerin nasıl deforme olduklarını ve akış özelliklerini inceleyen bir bilim dalıdır. Reolojik ölçümler, bir ürünün davranışını ve işlem, formülasyon değişimleri ve yaşlanma fenomeni gibi özelliklerinin önceden saptanmasında kullanılır (173). Bu ölçümler, kimyasal, mekanik ve termal işlemleri ve katkı maddelerinin etkisini izlemek için iyi bir yoldur.

Newton'a göre; viskozite, Newtonian sıvılar, yani ideal sıvılar için kayma hızından bağımsızdır. Viskozite ne kadar yüksek ise, kayma için gerekli kuvvet o derece büyüktür. Kayma da, bir preparatın özel kaplara doldurulması, dökme, yayma, püskürtme, karıştırma vb gibi fiziksel hareketlerde önem taşır. Bazı maddelerin viskozitesi, kayma hızından etkilenmez, bazılarının ki kayma hızı arttıkça artar, bazılarının ki ise düşer. Birçok kozmetik ürünün viskozitesi, geniş kayma aralığında ölçülür ve viskozite profilleri elde edilir (91,108,123,170).

1.4.7.1 Reolojik Özellikleri (Akış özellikleri)

Kozmetik alanda geçerli olan birçok farklı akış tipi vardır. Kayma hızındaki değişime bağlı olarak viskozitede değişim olmaz ise, bu akışa Newton akış adı verilir. Kayma hızındaki artış ile viskozite değişimi gösteren sistemler ise Newton olmayan olarak tanımlanır.

1.4.7.1.1 Newton Akışı

Su, çok seyreltik emülsiyon ve süspansiyonlar ve bazı yağlar bu tip akış gösterirler.

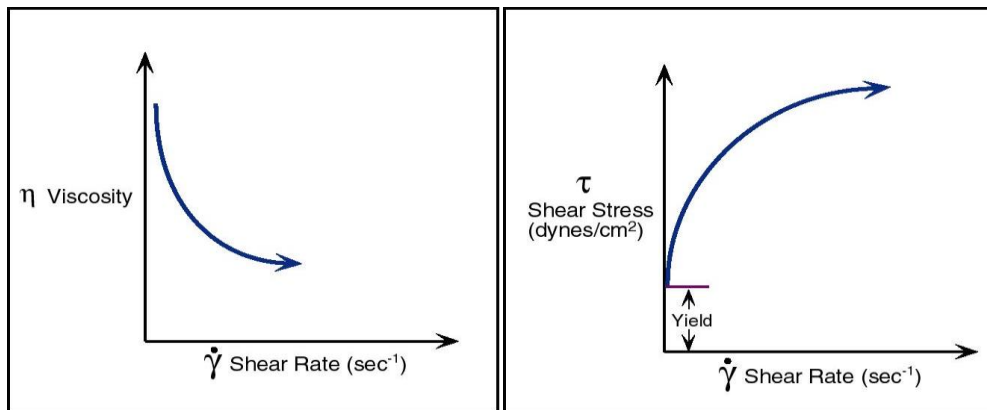
1.4.7.1.2 Newton Olmayan Akış Tipleri

Kayma hızına, zamana ve kayma gerilimine bağlı olarak viskozitede değişimin görüldüğü akış tipleridir.

Plastik Akış

Verim değeri (akışı başlatmak için gerekli minimum kuvvet) gösteren ve bu değer üzerinde kayma hızı değerlerinde viskozitede düşme görülen akış tipidir. Plastik akış, akışın kayma geriliminin belli bir değere ulaşmasından sonra başladığı durumdur. Bu değer “eşik değeri” adını alır.

Şekilde de görüldüğü gibi, plastik akış eğrisi orijinden geçmez (Şekil 4). Bu tip sıvılar hemen akmazlar ve kayma gerilimi belli bir eşik değerine ulaşınca akış görülür.



Şekil 4. Plastik Akış Eğrileri

a. Bingham Akış

Bingham akış gösteren maddeler, kendi başlarına akmaya başlamazlar. Verim değeri aşıldıktan sonra ise Newtonian akış gösterirler.

b. Casson Akışı

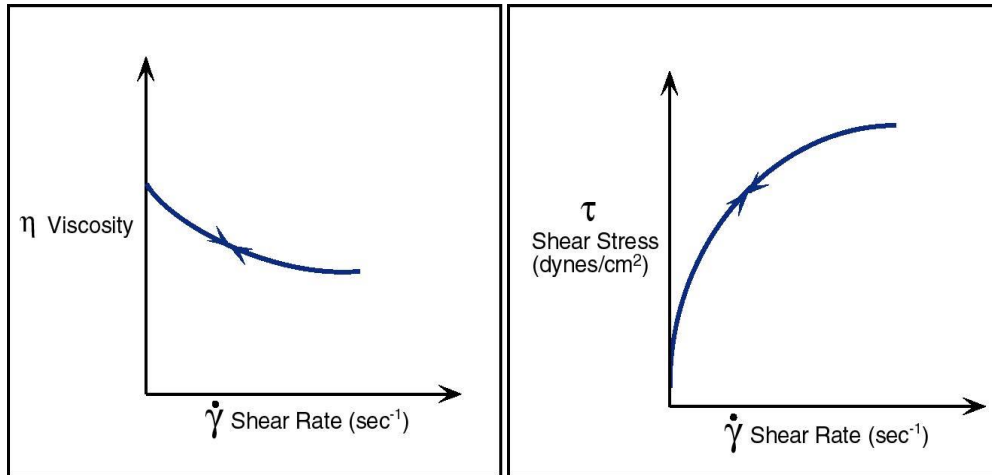
Bu tip akışta da, akışın başlayabilmesi için bir eşik değeri vardır. Ancak eşik değeri aşıldıktan sonra Newtonian akış görülmez. Casson modeli ideal olmayan bir plastik akış gösterir.

İdeal veya değil, tüm plastik sistemlerde, kayma hızı arttıkça, viskozitede düşme görülür.

Psödoplastik Akış

Viskozitenin artan kayma hızı ile azaldığı, ancak biçimsel değişimin sıfır noktasından başladığı akış tipidir, eğrisi orijinden başlar ve reogramla gösterilir (Şekil 5).

Bu akış tipini gösteren maddeler, dururken bir ağ yapısı oluştururlar. Kayma kuvveti ile bu yapı parçalanır ve kaymaya bağlı incelme görülür. Emülsiyonlar, dispersiyonlar ve süspansiyonlar bu akışı gösteren sistemlere örnek olarak verilebilir.



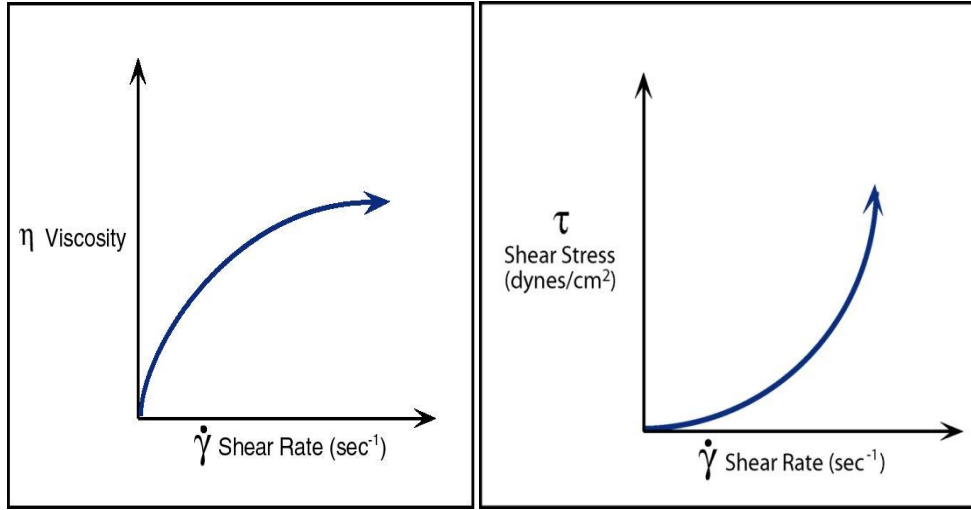
Şekil 5. Psödoplastik Akış Eğrileri

Dilatan Akış

Bazı derişik süspansiyonlar ve çözeltilerde olduğu gibi, artan kayma hızı ile viskozitede artışın görüldüğü akış tipidir (Şekil 6).

Kayma hızı arttıkça viskozitesi artan sistemlerdir. Psödoplastik akışın tersine burada kaymaya bağılı kalınlaşma görülür.

Diğer sistemlere göre daha az görülürler. Dilatan akış gösteren sistemlere örnek olarak; ıslak kum ve yağlı boya verilebilir (62,108,123, 167,170).



Şekil 6. Dilatan Akış Eğrileri

1.4.7.2 Tikotropi

Kaymaya bağılı incelme gösteren maddelerde, ağ yapı parçalanır ve sistemin viskozitesi azalır. Kayma kuvveti ortadan kaldırıldığında, belli bir zaman içinde başlangıç koşullarına dönülür. Kayma hızı azaldığında, yapı zaman içinde tekrar toparlanır ve viskozite başlangıçtaki değerine döner. Dolayısıyla, tiksotropi terimi, kaymaya bağılı olarak düşük viskozite gösteren ve belirli süre içinde başlangıçtaki yapısına geri dönen sıvı veya yarı-katı sistemler için kullanılır. Bu etki, karıştırma süresine ve kayma ortadan kaldırıldığında tekrar eski durumuna dönme süresine bağılı olarak ortaya çıkar (23).

1.4.7.3 Dinamik Özellikler

Birçok maddenin akışı, tek bir model ile açıklanamaz. Viskoelastik olarak tanımlanan bu maddeler için, sistemin elastik ve viskoz bileşenlerinin durumu incelenmelidir.

1.4.7.3.1 Viskoelastisite

Birçok maddenin akışı yukarıda sözü edilen modellerden biri ile açıklanamaz. İdeal elastik bir madde, uygulanan tüm enerjii saklar ve geri verir. İdeal viskoz madde ise, tam tersine, uygulanan enerjii emer ve kaybeder. Gerçek maddeler, her iki özelliği birleştirerek viskoelastik davranış gösterirler (49,158,170).

Hem viskoz hem de elastik özellik gösteren madde davranışına “viskoelastik özellik” denir. Viskoelastik sistemler, hem sıvıların viskoz özelliklerini hem de katıların elastik özelliklerini gösteren maddelerdir. Viskoelastik deformasyon elastik deformasyon ile viskoz akış özelliklerinin kombinasyonudur.

Eczacılıkta kullanılan krem, losyon, merhem, süspansiyon, supozituar, kolloidal dağılımlar ve emülsiyon gibi birçok sistem viskoelastik özellik gösterir. Emülsiyonların reolojik davranışı damlacıkların etkileşme kuvvetlerini anlamak için yardımcı olur. Damlacıklar arasında kolloidal etkileşme sonucu, üç-boyutlu ağ yapısı söz konusu olabilir. Bu ağ yapısı, enerji stoklama yeteneğine sahiptir. Dolayısıyla, sıvı özelliklerine ilaveten elastik katı özellikleri de kazanır.

Emülsiyon, süspansiyon gibi dispers sistemlerin, merhem, krem gibi yarı katı sistemlerin, şurup gibi çözeltilerin reolojik özellikleri, fizikokimyasal özellikler içinde en önemlisini oluşturur. Çünkü reolojik özellikler hem fiziksel stabiliteyi, hem kaliteyi, hem de kullanımı etkilemektedir (167).

1.4.7.4 Mekanik Özellikleri

Jellerin mekanik özelliklerini tayini, TA-XT Plus Texture analiz cihazı kullanılarak Texture profile analizi (TPA) ile yapılabilmektedir (Şekil 7). TPA ile incelenen test parametreleri jellerin sertliği, jellerin sıkıştırılabilirliği, jellerin adezifliği, jellerin kohezifliği ve jellerin elastikiyetidir.



Şekil 7. TA-XT Plus, Stable Micro System cihazı

1.5 Astaksantin Hakkında Genel Bilgiler

1.5.1 Astaksantin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kırmızı-turuncu renkli lipofilik özellikte bir karotenoid pigmentidir (Şekil 9,10).

Kimyasal Adı: 3,3'-dihidroksi-β, β-karoten-4,4'-dion (Şekil 8).

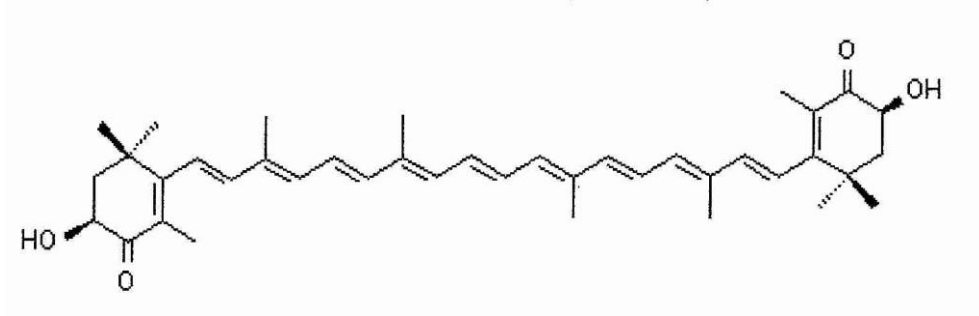
Moleküler Formülü: C₄₀H₅₂O₄

Moleküler Ağırlığı: 596.82 (95)

Çözünürlük: Dimetil sülfoksit (DMSO) (0.5 g/L), kloroform (10 g/L), diklorometan (30 g/L) ve aseton (0.2 g/L) gibi organik çözücülerde çözünür. (60).

Log P: 13.27 (oktanol/su)

Erime Derecesi: 182.5 °C (113).



Şekil 8. Astaksantin Kimyasal Yapısı



Şekil 9. Astaksantin İçeren Toz Alg Ekstresi



Şekil 10. Astaksantin %5 Oleoresin

1.5.2 Astaksantin Kaynakları

Astaksantin bazı eklembacaklılar, balıklar ve alglerden elde edilen kırmızı-turuncu renkli, lipofilik bir karotenoid pigmentidir. Astaksantin özellikle kabuklu deniz ürünlerinde, somon balığı ve alglerde bol miktarda bulunur. Astaksantin ilk defa bir istakoz ekstresinde 1938 yılında karakterize edilmiş ve isimlendirilmiştir. Çok güçlü antioksidan etkiye sahip bir pigment olan astaksantini hücre içinde yüksek miktarda biriktirme özelliğine sahip olan *Haematococcus pluvialis*'in (Chlorophyceae) kapalı sistemlerde (panel ya da tübüler fotobiyoreaktörler) yüksek ışık şiddetine (doygunluk noktasının üstünde) maruz bırakılarak ticari üretimi yapılmaktadır. *Haematococcus pluvialis*, uygun olmayan ortam koşullarında (başta yüksek ışık şiddeti olmak üzere, sıcaklık ve pH değerlerindeki dalgalanmalar, ortamda besin miktarının azalması vb.) biriktirdiği sekonder karotenoid olan astaksantin (3,3'-dihidroksi- β,β -karoten-4,4'-dion) içermesi nedeniyle biyoteknolojik olarak öneme sahiptir (14,99,154).

1.5.3 Astaksantin Endikasyonları

Astaksantin bir karotenoiddir. Terpenler olarak bilinen geniş bir fitokimyasal grubuna dahildir. Karotenoidlerin çoğu gibi renkli, yağda çözünür bir pigmenttir. Diğer bazı karotenoidlerden farklı olarak insan vücudunda A vitaminine dönüşmez.

A vitamini, insanda yüksek dozlarda toksik olmasına karşın, astaksantin toksik etki göstermez. Bununla birlikte astaksantin güçlü bir antioksidandır. Diğer karotenoidlerden 10 kat daha güçlü etki gösterir. İnsanda esas olarak beslenme desteği olarak kullanılır. Doğal kaynaklardan veya sentetik olarak hazırlanır.

Yapılan literatür araştırmalarında astaksantin içeren topikal bir formülasyona rastlanmamıştır. Literatürde; oral yoldan kullanılan astaksantin hücre sağlığı üzerine etkisi, antikanser aktivitesi, antiinflamatuvar etkisi ve immun sistem üzerine etkileri, antidiyabetik etkisi ve göz sağlığı üzerine etkileri, iskelet kas sistemi ve cilt sağlığı üzerindeki etkileri, kardiyovasküler sistem üzerinde antihipertansif ve nöroprotektif etkileri, sempatik sinir sistemi ve mikrosirkülasyon üzerine etkileri ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir (22,54,97,145,168).

1.5.4 Astaksantin Antioksidan Etkisi

Karotenoidler bitkilere sarı, kırmızı ve turuncu rengi veren pigmentlerdir. Doğada 600'ün üzerinde karotenoid vardır. Güçlü antioksidan etkinliği olan karotenoidlerin en önemlileri; β -karoten, astaksantin, lutein, likopen, zeaksantin, kantaksantindir. En iyi bilinenleri β -karoten olmasına rağmen son dönemde en çok ilgi çeken karotenoidlerden biri astaksantindir. Astaksantin yeni bilimsel çalışmalarda dikkat çekici hale gelmiştir. Astaksantin antioksidan etki mekanizması 2 şekildedir; serbest radikalleri temizleyip dağıtır ve serbest radikallerin yol açabileceği zincir reaksiyonlara karşı koruma görevi üstlenir ya da oluşmuş olan zincir reaksiyonları sonlandırır. Serbest radikallerin verdiği zararlara karşı, hücre membranını, hücre ve dokuları korur.

Karotenoidlerin keton ailesinden olan astaksantin özellikle deniz canlılarının (karides, yengeç, istakoz ve balık yumurtaları) kabuklarında doğal olarak bulunan kırmızı-turuncu renkli bir pigment olup, hücre membran yapısının korunmasında

etkili bir mekanizmaya sahip olduğu bildirilmektedir (51,152,153). Bazı canlılar renk pigmenti yönünden oldukça zengindirler. Astaksantin içeren Haematococcus pluvialis bir Chlorophyte alg türünden olup, organizmasında yüksek düzeyde astaksantin biriktirmektedir (154).

Astaksantin diğer karotenoidlere göre ısıya karşı dayanıklı olup, renk değişikliği göstermemektedir. Diğer antioksidanlara kıyasla yapısında oksijen içermesi ve lipofilik olması nedeniyle kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmektedir ve santral sinir sistemi ile beyin hücrelerini koruyucu etki gösterdiği bildirilmektedir (111,151).

Mitokondrium içinde gerçekleşen birden fazla oksidatif reaksiyon sonucunda oluşan serbest oksijen radikalleri hücrede oksidatif hasara neden olduğu bildirilmektedir (47). Yapılan çalışmalarda astaksantinın sıçan karaciğer hücrelerinde gerçekleşen peroksidasyona karşı Vitamin E'den 100 kat daha iyi koruduğu bildirilmiştir (9,100,111).

Astaksantin, antioksidan özellikleriyle bilinen E vitamini ve β -karotenden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Astaksantin, karotenoid pigmentleri grubundan çok güçlü bir antioksidandır (22,54,97,145,168).

1.5.5 Astaksantin Ticari Preparatları

Adrusen Mega Kapsül 30 Kapsül/Kutu (Teka)

Astaxanthin Complex Yumuşak Jelatin Kapsül 4 mg 30 Kapsül/Kutu (Solgar)

Bioxelin Krill Oil Soft Jel 60 Kapsül/Kutu (Areli İlaç)

Krilom Omega-3 & Astaksantin Soft Jel Kapsül 60 Kapsül/Kutu (Tab İlaç)

Nutramedica Omega 3 Krill Oil Kapsül 30 Kapsül/Kutu (Mensis Pharma)

Bioxelin Krill Oil Şurup 150 ml Şişe/Kutu (Areli İlaç) (155).

II. BÖLÜM

2 PRATİK ÇALIŞMALAR

2.1 Kullanılan Maddeler, Araç ve Gereçler

2.1.1 Kullanılan Maddeler

Astaksantin %5 Oleoresin	Tab İlaç
Astaksantin İçeren Alg Ekstresi	Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi
Metanol	Merck
Diklorometan	Merck
Asetonitril	Merck
Lesitin	AppliChem
İsopropil Miristat	AppliChem
Propilen Glikol	AppliChem
Etanol	Merck
Karbopol 974P	Lubrizol
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Merck
ABTS	Sigma Aldrich
Trolox	Sigma Aldrich
Potasyum persülfat	Sigma Aldrich
Soydum Hidrojen Fosfat	Merck
Sodyum Dihidrojen Fosfat	Merck
DPPH	Sigma Aldrich
Askorbik Asit	Sigma Aldrich
MTT	Sigma Aldrich

Serum içermeyen keratinosit besiyeri	Invitrogen
Rekombinant epidermal büyüme faktörü	Invitrogen
Sığır hipofiz ekstresi	Invitrogen
% 0.05 Tripsin-EDTA	Biological Industries
Tripan mavisi	Biological Industries

2.1.2 Kullanılan Araç ve Gereçler

YBSK	Hewlett Packard Agilent 1100
FT-IR	Perkin Elmer
Reometre	Haake Mars
Texture Profile Analizer	Ta-XT-Plus
Stabilite Kabini	Nüve TK 252
pH-metre	Inolab
Hassas Terazi	Sartorius TE 214S
Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientifica
Ultrasonik Su Banyosu	Elma Transsonic 660/H
Manyetik Karıştırıcılı Su Banyosu	Variomag
Çalkalayıcı	FALC-WB
CO ₂ inkübatörü	Thermo Scientific Model 370
Laminer hava akımlı kabin	Thermo Scientific Class II MSC-Advantage
İnverted floresan mikroskop	Leica DM IL
Faz kontrast mikroskop	Leica DM IL
Neubauer Hemositometre	Hausser Scientific
Fuxion FX7	Vilber Lourmat
Mikroplaka okuyucu	Molecular Devices VERSAmax Tunable
Spektrofotometre	VersaMax

2.2 Yöntem ve Deneyler

2.2.1 Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalar

2.2.1.1 Astaksantin'in Infrared (IR) Analizi

Astaksantin %5 oleoresinin metanol ile hazırlanan çözeltilisinin spektrumu, 400-4000 cm⁻¹ dalga sayıları arasında çizildi.

2.2.1.2 Astaksantin'in Ultraviyole Spektroskopisi

Astaksantin %5 oleoresin ve astaksantin içeren alg ekstresinin maksimum absorptans gösterdiği dalga boyunun (λ_{max}) saptanması için YBSK ile 400-800 nm arasında tarama yapıldı.

2.2.2 Etkin Madde Miktar Tayini Çalışmaları

2.2.2.1 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (YBSK) Çalışmaları

Mobil faz olarak asetonitril:su:metanol:diklorometan (45.5:4.5:28:22) kullanıldı. Çalışmada C18 kolon (25cmX4.6mm) ve DAD (photodiode array detector) dedektör kullanıldı. Kolon sıcaklığı 25 °C, akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi 20 µl'dir. Yöntemin güvenilirliğinin belirlenmesi için validasyon çalışmaları yapıldı.

2.2.3 Analitik Yöntem Validasyonu

Validasyon, etkin maddenin miktar tayini için yöntemin, doğru ve kesin bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanması için yapılması gereken bütün işlemleri kapsar. Böylece analizi yapılacak maddenin miktar tayininde kullanılan yöntemin güvenilirliği kanıtlanmış olur. Analitik validasyonun kabul edilebilirliğini sağlayan validasyon parametreleri aşağıda belirtilmiştir (156):

- Doğrusallık (Linearity)
- Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik (Accuracy and Recovery)
- Kesinlik (Precision)

- ✓ Tekrar edilebilirlik (repeatability)
- ✓ Tekrar elde edilebilirlik (reproducibility)
- Özgünlük, Seçicilik (Specificity)
- Stabilité (Stability)
- Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

2.2.3.1 Doğrusallık

Örnekteki maddenin belli sınırlar içindeki derişimi ile, elde edilen yanıtın orantılı olduğunun göstergesidir. Bunun için konsantrasyona karşılık gelen eğri altı alan değerlerinin doğrusal regresyon yöntemi ile regresyon doğrusu hazırlanır.

Bu amaçla, astaksantin DMSO ile 31.25 µg/mL konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden PBS:etanol (3:7) karışımıyla seyreltme ile 0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 25 µg/mL konsantrasyonlarında bir seri çözelti elde edildi. Her konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen eğri altı alan değerleri yardımıyla standart doğrunun denklemi ve determinasyon katsayısı bulundu.

2.2.3.2 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Saptanan değer gerçekte değere yakınlığıdır. Miktar tayini yönteminin doğruluğunu gösterir. Geri elde ile hesaplanır ve yöntemin doğruluğu geri alma yüzdesine bağlıdır.

Bu amaçla, astaksantin DMSO içerisindeki stok çözeltisinden PBS:etanol (3:7) karışımıyla seyreltme ile farklı konsantrasyonlarda (1, 5 ve 10 µg/mL) 6 seri çözelti hazırlandı ve eğri altı alanlar belirlenen λ_{max} değerlerinde okundu. Okunan eğri altı alan değerleri kalibrasyon denkleminde yerine konarak elde edilen konsantrasyonlardan % geri elde değerleri aşağıdaki eşitlik yardımıyla bulundu:

$$\% \text{Geri Elde} = \frac{C_{Pratik}}{C_{Teorik}} \cdot 100$$

C Pratik: Etkin maddelerin kalibrasyon denkleminde elde edilen konsantrasyon değerleri

C Teorik: 1, 5 ve 10 µg/mL

2.2.3.3 Kesinlik

Miktar tayininde kullanılan yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlık derecesidir. Standart sapma ve varyasyon katsayısı (bağıl sapma) ile ifade edilir. Kesinlik, bir yöntemin tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecelerinin de bir ölçüsüdür. Analitik yöntemin kesinliği için istatistiksel açıdan yeterli değerlendirmenin yapılacağı sayıda aynı konsantrasyondaki örnek ardı ardına ölçülerek aritmetik ortalama (X), standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirildi.

2.2.3.3.1 Tekrar Edilebilirlik

Standart doğru denklemi oluşturmak için hazırlanan stok çözeltiden hazırlanarak bir konsantrasyon (10 µg/mL) seçildi ve bu konsantrasyonda eğri altı değeri YBSK ile art arda 6 kez ölçüldü. Eğri altı alan değerlerine karşılık gelen konsantrasyonların ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı. Varyasyon katsayısının %2'den küçük olması yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermektedir.

2.2.3.3.2 Tekrar Elde Edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için, aynı stoktan hareket edilerek seyreltmeyle hazırlanan 6 adet aynı konsantrasyondaki (10 µg/mL) çözeltinin eğri altı alan değerleri ölçüldü ve bunlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ortalama, SS, VK hesaplandı. Bulunan varyasyon katsayısının %2'den küçük olması geçerli koşul olarak aranmaktadır.

2.2.3.4 Özgünlük, seçicilik

Miktar tayini yönteminin sadece analiz edilmesi istenen yapıyı saptayabilmesi için, etkin maddenin kullanıldığı formülasyonlara giren etkin madde dışındaki bileşenler taranarak spektrumları alındı.

2.2.3.5 Stabilite

Etkin maddenin belirli konsantrasyonda (10 µg/mL) çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti hazırlandığı andan itibaren 30, 60 ve 120. dakikalarda ve 6. 24. ve 48. saatlerde konsantrasyon ve eğri altı alan değerleri okunarak konsantrasyonda değişim olup olmadığı saptandı.

2.2.3.6 Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Teşhis sınırı (limit of detection: LOD) analizi yapılan maddenin kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile tayin edilebileceği en düşük konsantrasyondur. Sinyal/gürültü oranınının 3.3 katı olarak kabul edilmektedir.

Tayin sınırı (limit of quantitation: LOQ) analizi yapılan maddenin saptanabileceği en düşük konsantrasyondur. Sinyal/gürültü oranı 10 ile çarpılarak tayin sınırı belirlenmiştir.

Teşhis sınırı ve tayin sınırı çalışmalarında 10'ar örnekle çalışılmıştır.

2.2.4 Astaksantin İçeren Alg Ekstresinin Çözünürlük Çalışması

Astaksantin içeren alg ekstresinin PBS:etanol (3:7) ortamında çözünürlüğünü tayin etmek için etkin maddenin aşırı miktarı 5 mL'lik tüplere konuldu ve 3 mL'ye PBS:etanol (3:7) ile tamamlandı. 24 saat yatay çalkalayıcıda çalkalandı. Üstteki çözelti 0.45 µm membran filtreden süzöldükten sonra seyreltilerek YBSK sistemine enjekte edildi. Elde edilen eğri altı alan değeri standart doğru denklemde yerine konularak çözünmüş etkin madde miktarı hesaplandı.

2.2.5 Astaksantin İçeren Alg Ekstresindeki Astaksantin Miktarı Tayini

Astaksantin içeren alg ekstresinden 0.01 g tartıldı. Balon jode 10 mL'ye DMSO ile tamamlandı. Çözelti 0.45 µm membran filtreden süzülerek YBSK sistemi ile etkin madde miktar tayini yapıldı. Deney 3 kez tekrarlandı.

2.2.6 Formülasyon Çalışmaları

2.2.6.1 Formülasyonların Hazırlanması

Tablo 1. Formülasyonların gram cinsinden terkip tablosu

Kod	Karbopol	Distile su	Lesitin	İPM	PG	Etanol	AE	AO
AE-L	0,96	46,6	0,24	4,8	27,6	13,5	6,3	
AO-L	1	49	0,25	5	29	14,75		1
AE-K	2	91,7					6,3	
AO-K	2	97						1

2.2.6.1.1 Astaksantin %5 Oleoresin Lipojel (AO-L) Hazırlanması

0.25 g yumurta lesitini; 5 g isopropil miristat, 29 g propilen glikol ve 14.75 g etanol karışımında çözündürüldü. 1 g astaksantin %5 oleoresin bu karışıma ilave edildi ve homojenleşinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 1 g karbopol, 49 g distile su içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün trietanolamin ile sistemin jelleşmesi sağlandı. Astaksantin %5 oleoresin karışımı, kısım kısım bu sisteme ilave edildi (141). Formülasyondaki astaksantin konsantrasyonu 500 µg/g'dır.

2.2.6.1.2 Astaksantin %5 Oleoresin Karbopol Jel (AO-K) Hazırlanması

2 g karbopol, 97 g distile su içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün trietanolamin ile sistemin jelleşmesi sağlandı. 1 g astaksantin %5 oleoresin bu karışıma ilave edildi ve homojenleşinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Formülasyondaki astaksantin konsantrasyonu 500 µg/g'dır.

2.2.6.1.3 Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Lipojel (AE-L) Hazırlanması

0.24 g yumurta lesitini; 4.8 g isopropil miristat, 27.6 g propilen glikol ve 13.5 g etanol karışımında çözündürüldü. 6.3 g astaksantin içeren alg ekstresi bu karışıma

ilave edildi ve homojenleşinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 0.96 g karbopol, 46.6 g distile su içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün trietanolamin ile sistemin jelleşmesi sağlandı. Astaksantin içeren alg ekstresi karışımı, kısım kısım bu sisteme ilave edildi (141). Formülasyondaki astaksantin konsantrasyonu 500 µg/g'dır.

2.2.6.1.4 Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Karbopol Jel (AE-K) Hazırlanması

2 g karbopol, 91.7 g distile su içerisinde bir gece bekletildi. Ertesi gün trietanolamin ile sistemin jelleşmesi sağlandı. 6.3 g astaksantin içeren alg ekstresi bu karışıma ilave edildi ve homojenleşinceye kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Formülasyondaki astaksantin konsantrasyonu 500 µg/g'dır.

2.2.6.2 Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

2.2.6.2.1 Makroskobik İncelemeler

Hazırlanan jel formülasyonlarının görünüşü, rengi, yapısı ve faz ayrımı olup olmadığı makroskobik olarak incelendi.

2.2.6.2.2 pH Ölçümleri

Formülasyonların pH değerleri pH metre cihazına jel ölçüm probu takılarak, belirli aralıklarla yapıldı.

2.2.6.2.3 Reoloji ve Viskozite Tayini

Reolojik çalışmalar için Haake reometre ile çalışıldı (Şekil 11).



Şekil 11. Haake osilasyon reometre

Bu çalışmada, 60 mm çapında 1° açılı plate/plate sistemi (35 mm, gap 0.3 mm, 0.1-10.0 Hz) kullanıldı ve sistemin sıcaklığı ölçümler süresince 25°C 'de ve 32°C 'de sabit tutuldu (159). Formülasyonlar üzerinde ayrıca osilasyon ölçümleri yapıldı. Formülasyonların elastik (G') ve viskoz modül (G'') değerleri hesaplandı.

2.2.6.2.4 Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayini

Farklı oranlarda hazırlanan jellerin mekanik özelliklerini tayin etmek için TA-XT Plus Texture analiz cihazı kullanılarak Texture profile analizi (TPA) yapıldı (132). Test için aşağıda verilen parametreler kullanıldı. Teste başlamadan önce jeller beherlere yerleştirildi. Aletin probu jelin içine 2.0 mm/saniye hızla 15 mm batırıldı ve jelin yüzeyine geri çekildi, 15 saniye beklendikten sonra prob jele ikinci defa batırıldı ve geri çekilerek test bitirildi. Elde edilen güç-zaman eğrisi kullanılarak jellerin sertliği, adezifliği, kohezifliği, elastikiyeti ve sıkıştırılabilirliği hesaplandı (122). Test, her bir jel formülasyonu için 6 kez tekrarlandı ve standart sapmalar hesaplandı.

Test Parametreleri

Prob:	Perspex (10 mm çap)
Test öncesi probun hızı:	2.0 mm/saniye
Test esnasında probun hızı:	2.0 mm/saniye
Test sonrası probun hızı:	2.0 mm/saniye
Hedef modu:	Mesafe
Probun jele batma mesafesi:	15.0 mm
Probun ikinci batmadan önce bekleme süresi:	15.0 saniye
Teste başlamak için probun hissetmesi gereken kuvvet:	0.05 N

2.2.6.2.4.1 Jellerin Sertliği

Sertlik, jelin deformasyonunu sağlamak için gerekli olan kuvvet olup, tanımlamak için elde edilen güç-zaman eğrisinden jellerin sertliği hesaplandı. Probun birinci batma periyodunda elde edilen maksimum güç değeri jellerin deformasyonu için gerekli sertlik değerini vermektedir (Şekil 12). Sertlik değeri Newton (N) olarak hesaplanmıştır.

2.2.6.2.4.2 Jellerin Sıkıştırılabilirliği

Sıkıştırılabilirlik, jeli deforme etmek için gerekli olan işi tanımlamakta olup, elde edilen güç-zaman eğrisinden jellerin sıkıştırılabilirliği hesaplandı. Probun jele birinci batma periyodu süresince elde edilen eğrinin altında kalan alan (AUC_1) jelin sıkıştırılabilirlik değerini vermektedir (Şekil 12). Sıkıştırılabilirlik değeri Newton x mm olarak hesaplanmıştır.

2.2.6.2.4.3 Jellerin Adezifliği

Adeziflik, jelin yüzeyi ile probun yüzeyi arasındaki çekme kuvvetlerini yenmek için gerekli işi tanımlamakta olup, elde edilen güç-zaman eğrisinden jellerin

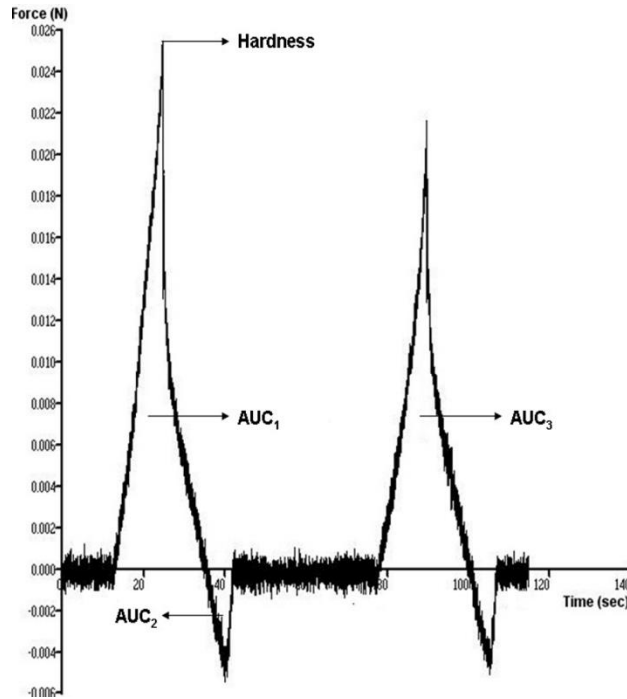
adezifliği hesaplandı. Probun birinci batma periyodundan sonra ilk geri çekme periyodu süresince elde edilen eğrinin altında kalan alan (AUC_2) adeziflik değeri vermektedir (Şekil 12). Adeziflik işinin birimi Newton x mm olarak hesaplanmıştır.

2.2.6.2.4.4 Jellerin Kohezifliği

Elde edilen kuvvet-zaman eğrisinden jellerin kohezifliği hesaplandı. İkinci batma periyodunda elde edilen eğrinin altında kalan alanın (AUC_3), birinci batma periyodunda elde edilen eğri altında kalan alana (AUC_1) oranı koheziflik değeri vermektedir. (Şekil 12).

2.2.6.2.4.5 Jellerin Elastikiyeti

Elde edilen kuvvet-zaman eğrisinden jellerin elastikiyeti hesaplandı. İkinci batma periyodunda maksimum yapısal deformasyon meydana getirmek için gerekli zamanın, birinci batma periyodundaki maksimum deformasyon meydana getirmek için gerekli zamana oranı, jellerin elastikiyetini göstermektedir (Şekil 12).



Şekil 12. Jel formülasyonuna ait TPA grafiği

2.2.6.2.5 Etkin Madde Miktar Tayini

0.2 g jel tartıldı, balon jode DMSO ile 10 mL'ye tamamlandı. 5 dk çalkalandı ve formülasyonun çözünmesi sağlandı. Çözelti 0.45 µm membran filtreden süzülerek YBSK sistemi ile etkin madde miktar tayini yapıldı. Her formülasyon için deney 3 kez tekrarlandı. Aynı işlemler formülasyona giren yardımcı maddelerin etkin maddenin pikleri ile girişim yapıp yapmadığını belirlemek için, boş jel formülasyonlarıyla da tekrarlandı.

2.2.6.3 Formülasyonların Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların stabilite kabininde (Nüve TK 252) 25°C sıcaklık-% 60 relatif rutubet koşullarında ve buzdolabında +4 °C'de 3 aylık stabilite çalışmaları yapıldı. pH, reoloji ve viskozite tayini, etkin madde miktarı parametreleri ele alındı.

2.2.7 In Vitro Salım Çalışmaları

Salım çalışmaları için 1 g jel, 100 mL PBS:etanol (3:7) bulunan beherlere yerleştirildi. Beherler parafilm ile kapatılarak 37°C'deki manyetik karıştırıcı su banyosunda 600 devir/dakikada karıştırıldı. Tüm sistemin üzeri kapatılarak karanlık bir ortam sağlandı. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 8. ve 24. saat aralıklarında 1 ml örnek alınarak, 480 nm'de YBSK ile absorbansları ölçüldü. Alınan örneğin yerine reseptör fazdan eşit miktar ilave yapıldı (43).

2.2.8 Antioksidan Aktivite Tayini Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların antioksidan aktiviteleri 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi ve Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAK) yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

2.2.8.1 Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi Tayini

Formülasyonların serbest radikal süpürme kapasitesi DPPH radikalinin süpürülmesine dayanan bir yöntem ile test edilmiştir.

Bu metot DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. DPPH radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden bir tanesidir (Şekil 13). DPPH radikali koyu menekşe renkte olup 517 nm’de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Radikal süpürücü ile muamele olan DPPH çözeltisinin koyu menekşe rengi açılır ve absorbanstaki azalma spektrofotometreyle ölçülür. DPPH çözeltisindeki daha fazla renk açılması, reaksiyon karışımının absorbanсында daha fazla düşme, dolayısıyla yüksek radikal süpürme kapasitesi demektir (162).

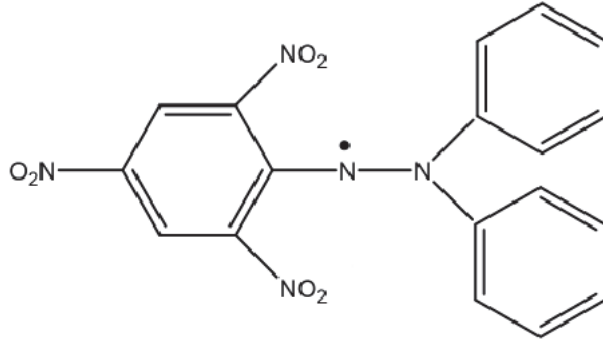
Yapılan çalışmada standart olarak askorbik asidin dimetil sülfoksitteki çözeltileri (2, 4, 8, 12, 16, 20 µg/ml) kullanılmıştır. Örnekler ve standart, DMSO içerisinde çözündürülerek farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikrolaka kuyucuklarına 100 µL örnek çözeltisi eklendikten sonra 100 µL DPPH radikali (200 µM) ilave edilerek karıştırılmıştır. Ardından oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda köre karşı mikrolaka okuyucuda 517 nm dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Her bir ölçüm üç defa tekrar edilmiştir. Örneklerin % inhibisyon değerleri aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100,$$

A_B : DPPH radikalinin absorbanı

A_A :Örneğin absorbanı

Sonuçlar “ortalama % inhibisyon değeri ± ortalama standart sapma” olarak ifade edilmiştir.



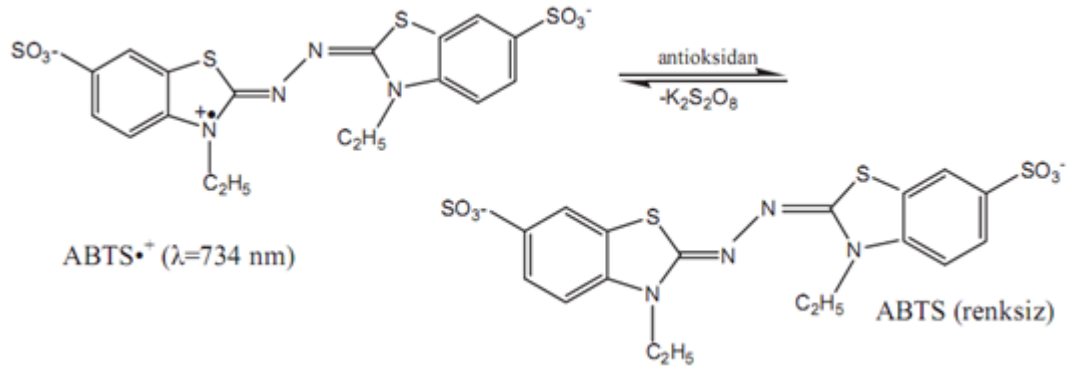
Şekil 13. DPPH radikalinin kimyasal formülü

2.2.8.2 Total Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini Yöntemi

TAK tayini, troloksa eşdeğer total antioksidan kapasiteyi gösteren bir yöntemle saptanır.

Troloks eşdeğer antioksidan kapasite tayini, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit'e (Troloks) eşdeğer total antioksidan kapasiteyi gösteren bir yöntemle saptanır (130). Suda çözünen bir E vitamini türevi olan Troloks, TAK tayinleri için en çok kullanılan standarttır. Bu yöntemde, ortamda bulunan ABTS⁺ (2,2'-Azino-bis(3-etilbenz-tiazoline-6-sülfonik asit)) radikalinin 734 nm dalga boyunda absorbanı sabitlendikten sonra ortama ilave edilen plazma örneğindeki antioksidanların etkisiyle, absorbansta meydana gelen azalma, kolorimetrik olarak tayin edilir. Stok ABTS çözeltisindeki ABTS' nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu 734 nm' de maksimum absorbanı gösteren mavi/yeşil kromofor ABTS⁺ radikali meydana gelir (Şekil 14). Radikalın absorbanı 30° C' de 12- 16 saat içinde sabitlenir ve iki gün süreyle stabil kalır. Ancak ortamda hidrojen verici antioksidanların bulunması ile radikal indirgenmeye başlar ve radikal katyonun absorpsiyonunda zamana bağlı olarak düşüş olur. Bu düşme, yüzde inhibisyon olarak ifade edilip aynı koşullar altında yapılan bir çalışma ile çizilen

troloks standart eğrisinden hareketle TAK tayini yapılır.



Şekil 14. ABTS'nin potasyum persülfatla oksidasyonu

Bu deneyde karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 16 saat inkübe edilen 7 mM stok ABTS⁺ radikal çözeltisinin 734 nm' de 1 mL 5 mM fosfat tamponuna (pH: 7.4) karşı 0.700 ± 0.02 absorbans gösterdiği konsantrasyondaki, yüzde inhibisyonu 'sıfır' olarak belirlenmiştir. Bu nedenle ABTS çözeltisinin absorbansı 0.700 ± 0.02 olacak şekilde 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile seyreltildi. Bu çözeltiden örnek küvetine 1 mL eklenerek, 30°C sıcaklığa sabitlenmiş spektrofotometrede, 5 mM fosfat tampon (pH:7.4) çözeltisine karşılık 734 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Bu değer A_{ABTS+} olarak kaydedildikten sonra küvet içeriğine 10 µL örnek çözeltisi ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Küvet içeriğinin homojen olması için küvet kapağı kapatılarak birkaç defa karıştırıldı. Aynı dalga boyunda (734 nm) 6. dakikaya kadar olan absorbans değeri gözlemlendi ve 6. dakikadaki köre karşı okunan absorbans A_{6.dk} olarak kaydedildi. Elde edilen bu değerlerden sonra yüzde inhibisyon oranı aşağıdaki şekilde her örnek için ayrı hesap edildi.

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{ABTS}^+} - A_{6. dk}) \times 100 / A_{\text{ABTS}^+}$$

Troloks standart eğrisinde % inhibisyon değerlerinin karşılık geldiği troloks eşdeğer konsantrasyonu belirlendi. Sonuçlar, 'mM Troloks'a eşdeğer antioksidan

kapasite' olarak verildi. Her örnek için üçer ölçüm alındı ve sonuçlar hesap edilirken üç ölçümün ortalaması kullanıldı.

2.2.9 Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.9.1 Sitotoksitate Testi

Hazırlanan preparatların sitotoksik etkileri, enzimatik bir yöntem olan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile belirlendi. Bir tetrazolyum tuzu olan MTT, metabolizmanın canlılığına dayanarak sitotoksitenin kantitatif ve kolorimetrik olarak ölçülmesine olanak sağlayan bir testtir (36,58).

Yöntemin esası, MTT boyasının tetrazolium halkasının parçalanabilmesi ilkesine dayanmaktadır. MTT canlı hücrelere absorbe olarak hücrelerin mitokondrilerinde bulunan süksinat-dehidrojenaz (krebs siklusu enzimi) enzimine spesifik olarak bağlanır. Bu bağlanmanın sonunda suda çözünmeyen koyu mavi renkte kristaller oluşur. Kristaller, DMSO ve izopropanol gibi organik çözücülerde kolayca çözünür. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağımlı olarak spektrofotometrede görünür dalga boyunda ölçülebilen bir absorbans verir. Oluşan rengin şiddeti canlı hücre sayısı ile orantılı olup, okunan absorbans değeri canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir (36,58,105).

Yapılan çalışmada sitotoksitate deneyi için, ölümsüzleştirilmiş sağlıklı insan böbrek proksimal tübüler epitelyal hücre hattı (HK-2) kullanıldı. HK-2 hücreleri, epidermal büyüme faktörü ve sığır hipofiz ekstresi eklenmiş serum içermeyen keratinosit besiyerinde, konvansiyonel hücre kültürü koşulları olan 37°C'de, % 5'lik CO₂ inkübatöründe çoğaltıldı. Deney gününden bir gün önce hücreler toplanarak mikroskop altında sayıldı ve 7.5×10^5 hücre /kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına ekildi.

Ertesi gün hücrelere 2 nM, 4 nM, 8 nM, 16 nM ve 32 nM konsantrasyonlarda astaksantin içeren formülasyonlar uygulandı. Uygulama yapılan hücreler 48 saat süre ile inkübe edildiler. Kontrol grubu olarak hazırlanan hücrelere ise formülasyonların çözücüsü olarak kullanılan DMSO uygulandı.

İnkübasyon süresinin sonunda hücrelerin besi yeri uzaklaştırılarak steril PBS ile yıkandı. Ardından her bir kuyucuğa 200 µL besiyeri ve 20 µL MTT çözeltisi (5 mg/mL) eklenerek hücreler 3 saat 37°C’de inkübe edildi. Sürenin sonunda, besi yeri-MTT karışımı uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 200 µL DMSO eklenerek oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda örneklerin absorbansı, hücre içermeyen besiyeri ve DMSO’lu hücrelere karşı mikropłaka okuyucuda 570 nm’de ölçüldü. Kontrol kuyucuklarının absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Formülasyon uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak ifade edildi.

2.2.10 Araştırma Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Formülasyonlardan elde edilen salım verileri ve sitotoksisite testi bulguları, T Testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Anlamlı farklılık seviyesi %95 olarak alındı (P<0.05).

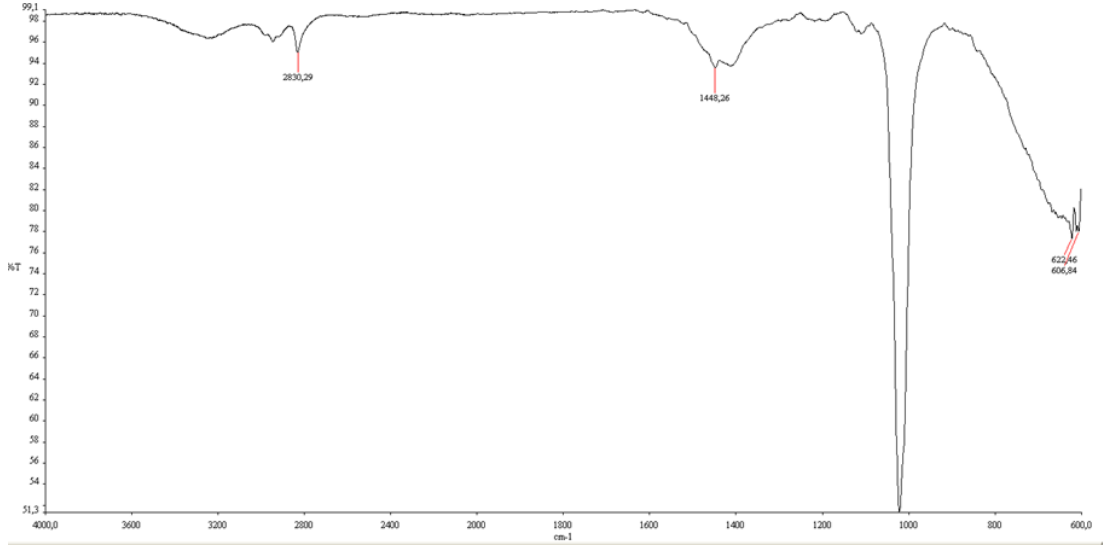
III. BÖLÜM

3 BULGULAR

3.1 Etkin Madde Üzerinde Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

3.1.1 Astaksantin'in Infrared (IR) Analizine Ait Bulgular

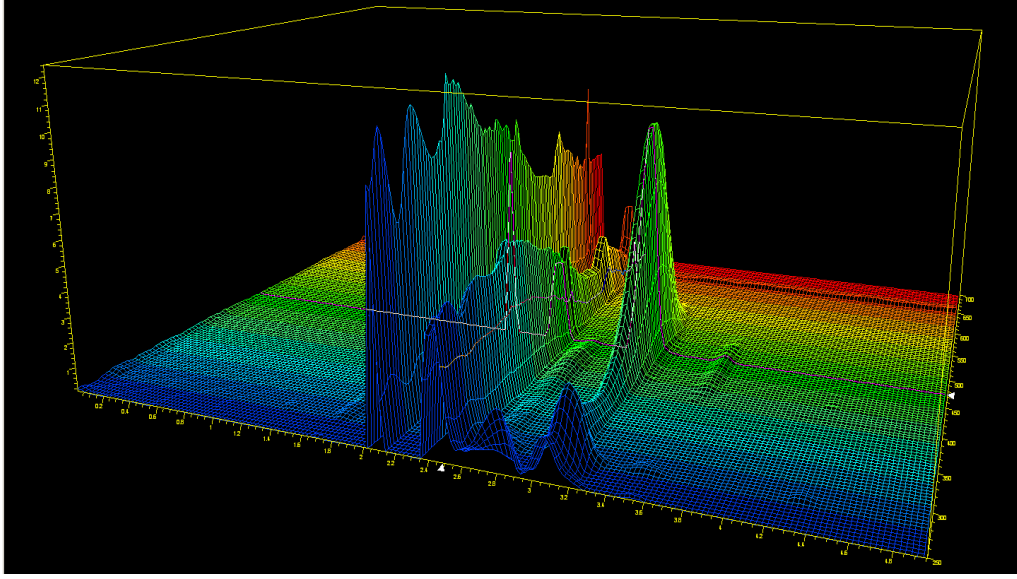
Astaksantin %5 oleoresin'in IR spektrumunun gösterdiği absorpsiyon bantları; 606, 622, 1047, 1448 ve 2830 cm^{-1} olarak bulunmuştur. Bu değerler, literatürlerde verilmiş IR bantları ile uyumludur (20) (Şekil 15).



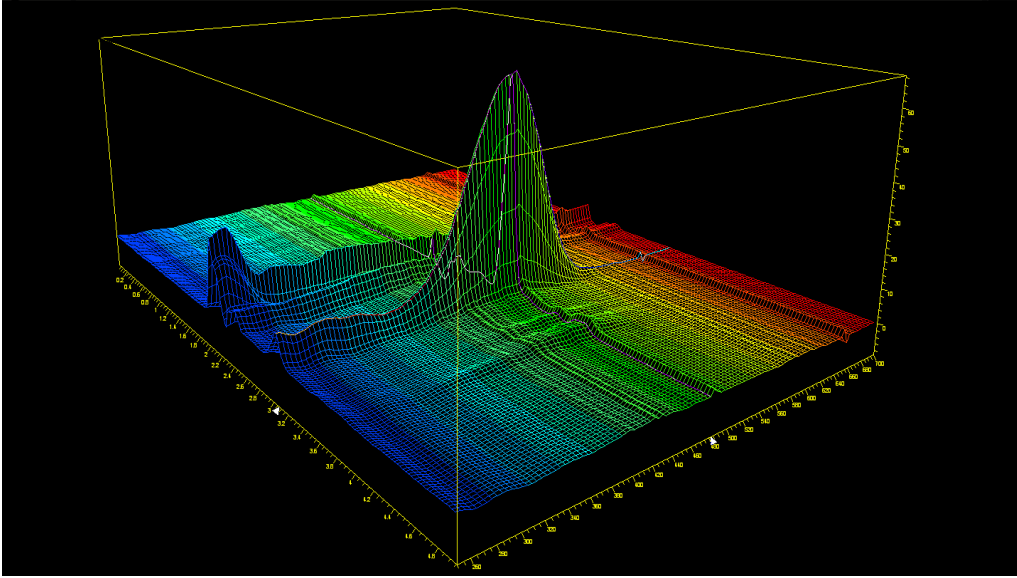
Şekil 15. Astaksantin'in IR Spektrumu

3.1.2 Astaksantin'in Ultraviyole (UV) Spektroskopisine Ait Bulgular

Astaksantin %5 oleoresin ve astaksantin içeren alg ekstresinin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{max}) 480 nm olarak belirlendi. Maksimum dalga boyu olarak saptanan bu değer, literatürde astaksantin için belirtilen dalga boyuna uygunluk göstermektedir (61) (Şekil 16,17).



Şekil 16. Astaksantin %5 Oleoresin'in UV Spektrumu



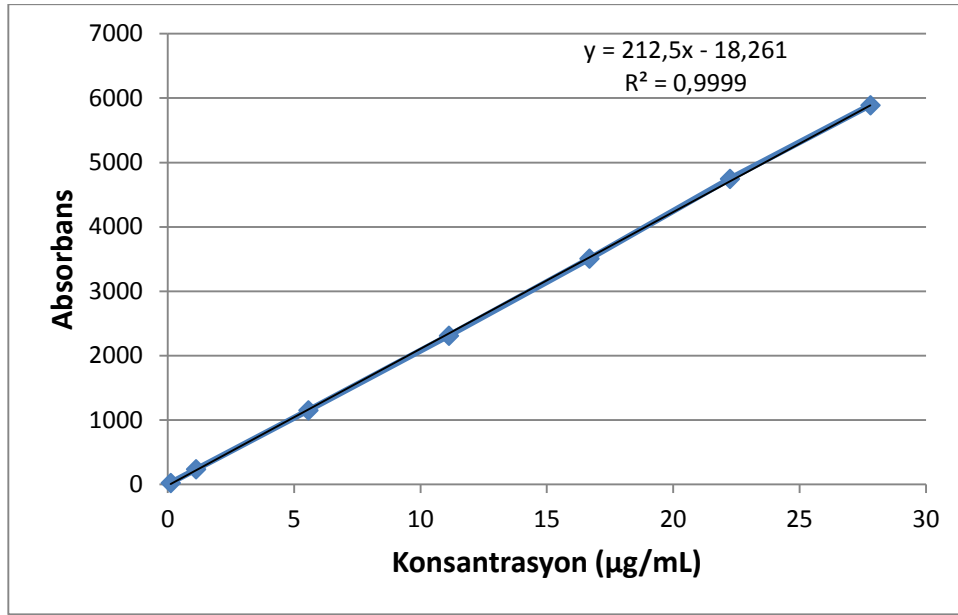
Şekil 17. Astaksantin içeren alg ektresinin UV spektrumu

3.2 Analitik Yöntem Validasyonuna Ait Bulgular

3.2.1 Doğrusallık

Yöntem 2.2.3.1'de anlatıldığı gibi standart doğru ve determinasyon katsayısı

Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 18. Astaksantin YBSK ile elde edilen standart doğrusu

3.2.2 Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik

Yöntem 2.2.3.2’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik Bulguları

Seri No	1. Konsantrasyon (1µg/mL)			2. Konsantrasyon (5µg/mL)			3. Konsantrasyon (10µg/mL)		
	Eğri Altı Alan	Bulunan C (µg/mL)	Geri Elde (%)	Eğri Altı Alan	Bulunan C (µg/mL)	Geri Elde (%)	Eğri Altı Alan	Bulunan C (µg/mL)	Geri Elde (%)
1	209,9	1,074	107,4	1051,2	5,033	100,66	2077,8	9,864	98,64
2	208,8	1,069	106,9	1016,3	4,869	97,38	2110,4	10,017	100,17
3	209,8	1,073	107,3	1040,5	4,982	99,64	2095,3	9,946	99,46
4	210	1,074	107,4	1010,6	4,842	96,84	2058,7	9,774	97,74
5	212,9	1,088	108,8	1044,2	4,999	99,98	2049,8	9,732	97,32
6	207,7	1,063	106,3	1043,9	4,998	99,96	2050,3	9,734	97,34
Ort.	209,85	1,074	107,4	1034,45	4,954	99,08	2073,7	9,845	98,45
SS	1,735	0,008	0,8	16,732	0,078	1,569	25,195	0,119	1,186
VK(%)	0,827	0,745	0,745	1,617	1,574	1,584	1,215	1,209	1,205

3.2.3 Kesinlik

3.2.3.1 Tekrar Edilebilirlik

Astaksantinin yöntem 2.2.3.3.1’de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlanan örnekleri YBSK ile 480 nm dalga boyunda 6 kez art arda okundu. VK % 2’den küçük olduğu için yöntemin tekrar edilebilir olduğu saptanmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. Tekrar Edilebilirlik Bulguları

Örnek No	Eğri Altı Alan	C
1	2119,915	10,062
2	2108,015	10,006
3	2099,7275	9,967
4	2091,015	9,926
5	2100,79	9,972
6	2095,4775	9,947
	Ort.	9,98
	SS	0,048
	VK (%)	0,48

3.2.3.2 Tekrar Elde Edilebilirlik

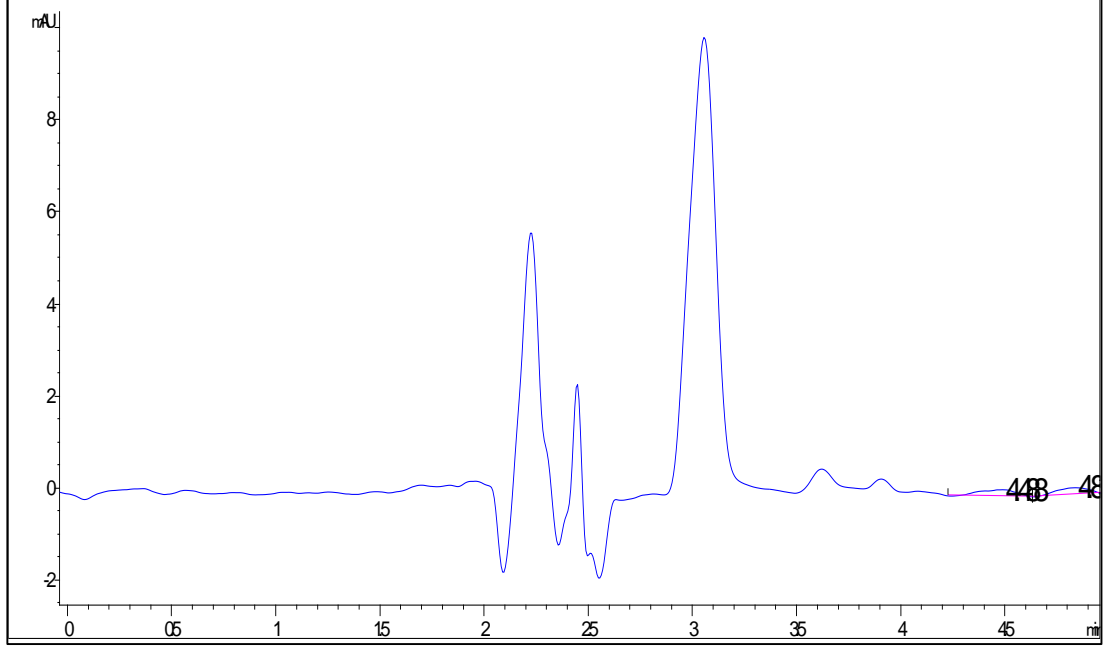
Yöntem 2.2.3.3.2’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Aynı konsantrasyonda 6 farklı örneğin ölçüm sonucu elde edilen konsantrasyon değerleri Tablo 4’de gösterilmiştir. Varyasyon katsayısı % 2’den az bulunmuştur.

Tablo 4. Tekrar Elde Edilebilirlik Bulguları

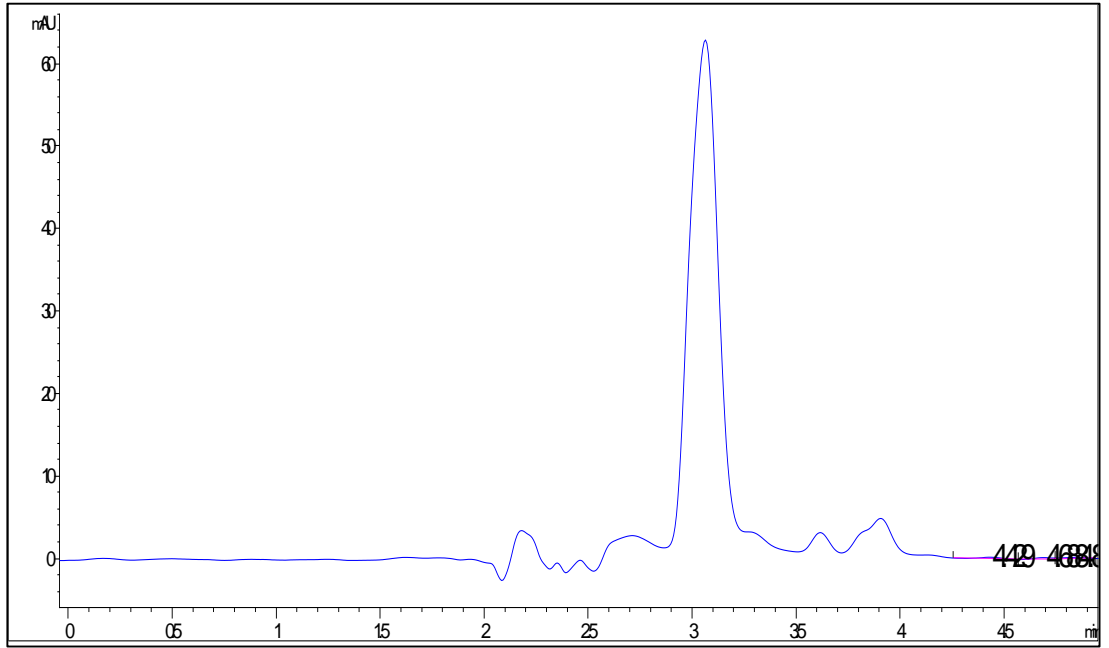
Örnek No	Eğri Altı Alan	C
1	2077,84	9,864
2	2110,3525	10,017
3	2095,265	9,946
4	2058,715	9,774
5	2049,79	9,732
6	2050,215	9,734
	Ort.	9,845
	SS	0,119
	VK (%)	1,209

3.2.4 Özgünlük, seçicilik

Boş formülasyondan yapılan salım çalışması sonucunda etkin madde piki ile formülasyondaki maddelerin piklerinin çakışmadığı görülmüştür (Şekil 19,20).



Şekil 19. Astaksantin %5 oleoresin'in YBSK ile elde edilen pik grafiği



Şekil 20. Astaksantin içeren alg ekstresinin YBSK ile elde edilen pik grafiği

3.2.5 Stabilité

Yöntem 2.2.3.5’de anlatıldığı gibi çalışıldı ve elde edilen konsantrasyon değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi (Tablo 5).

Tablo 5. Stabilité Bulguları

Zaman (Saat)	Eğri Altı Alan	C (10µg/mL)
0,5	2110,352	10,017
1	2103,977	9,987
2	2105,677	9,995
6	2112,265	10,026
24	2095,052	9,945
48	2101,852	9,977
	Ort.	9.991
	SS	0,029
	VK (%)	0,29

3.2.6 Teşhis Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Yöntem 2.2.3.6’da anlatıldığı üzere yapılan çalışmada LOD 3.3×10^{-4} µg/mL ve LOQ 10^{-3} µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

3.3 Astaksantin İçeren Alg Ekstresinin Çözünürlük Çalışmasına Ait Bulgular

Yöntem 2.2.4’te anlatıldığı gibi çalışıldı. Üç paralel örnekten elde edilen konsantrasyonların ortalama değeri 56 µg/mL olarak bulunmuştur.

3.4 Astaksantin İçeren Alg Ekstresindeki Astaksantin Miktarı Tayinine Ait Bulgular

Yöntem 2.2.5’te anlatıldığı gibi çalışıldı. YBSK yöntemi ile elde edilen eğri altı alan değeri standart doğru denklemine yerine konularak konsantrasyon bulundu. Astaksantin içeren 0.01 g alg ekstresindeki astaksantin miktarı 80 µg olarak bulunmuştur. Astaksantin içeren alg ekstresindeki yüzde astaksantin miktarı % 0.8 olarak tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Astaksantin İçeren Alg Ekstresindeki Astaksantin Miktarı Tayinine Ait Bulgular

Eğri altı alan (Absorbans)	Konsantrasyon (µg/mL)	Yüzde Etkin Madde Miktarı
1681.7	8	%0.8

3.5 Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.5.1 Makroskobik İncelemeler ve pH Ölçümlerine Ait Bulgular

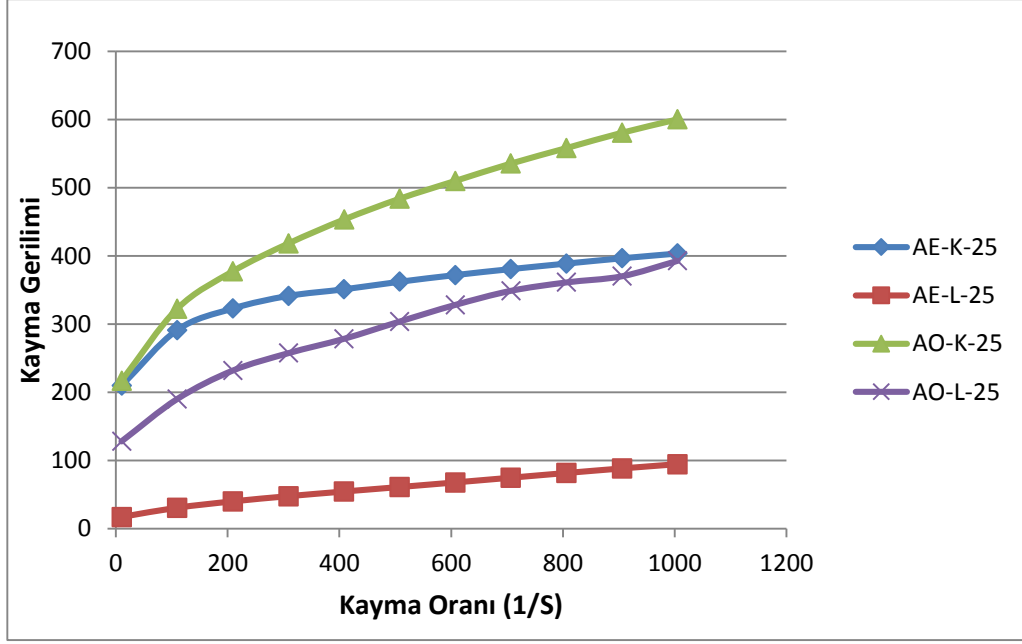
Yöntem 2.2.6.2.1 ve 2.2.6.2.2’de belirtildiği şekilde jeller incelenmiştir. Astaksantin %5 oleoresin içeren hidrojel ve lipojeller mor renkte, astaksantin içeren alg ekstresi içeren hidrojel ve lipojeller ise kırmızı renktedir. pH değerleri 4.52-4.87 aralığında gözlenmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Jellerin Genel Özellikleri

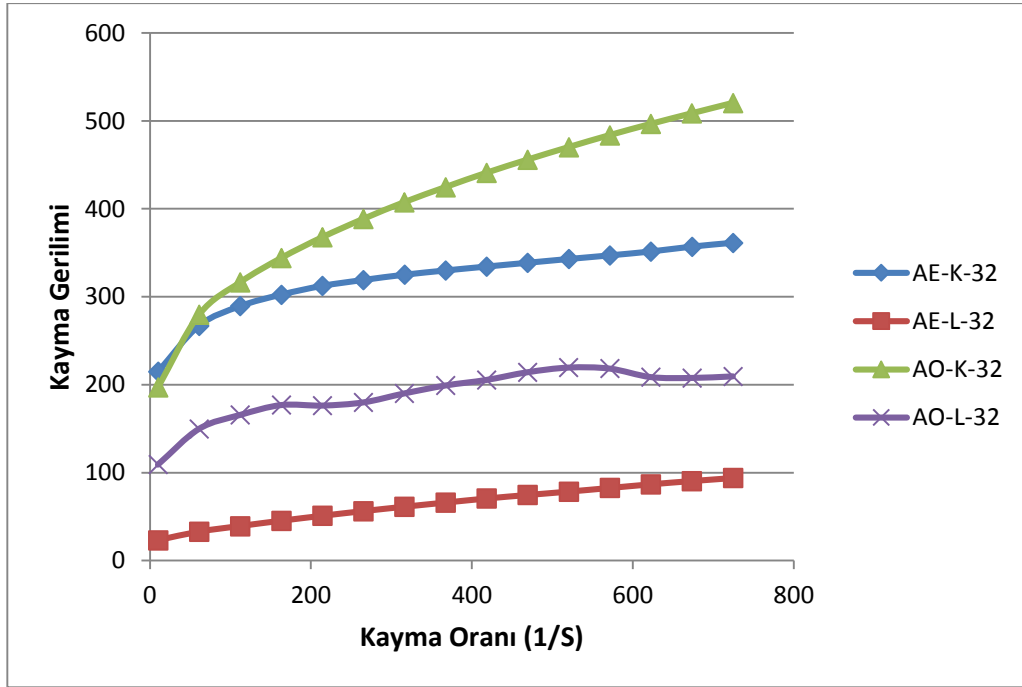
Formülasyon Kodu	Makroskobik Özellikler	pH
AO-L	Mor renkte, homojen, akışkan	4,75
AO-K	Mor renkte, homojen, viskoz	4,66
AE-L	Kırmızı renkte, homojen, akışkan	4,87
AE-K	Kırmızı renkte, homojen, viskoz	4,76
Boş Lipojel	Beyaz renkte, homojen, akışkan	4,64
Boş Karbopol Jel	Şeffaf, homojen, viskoz	4,52

3.5.2 Reoloji ve Viskozite Tayinine Ait Bulgular

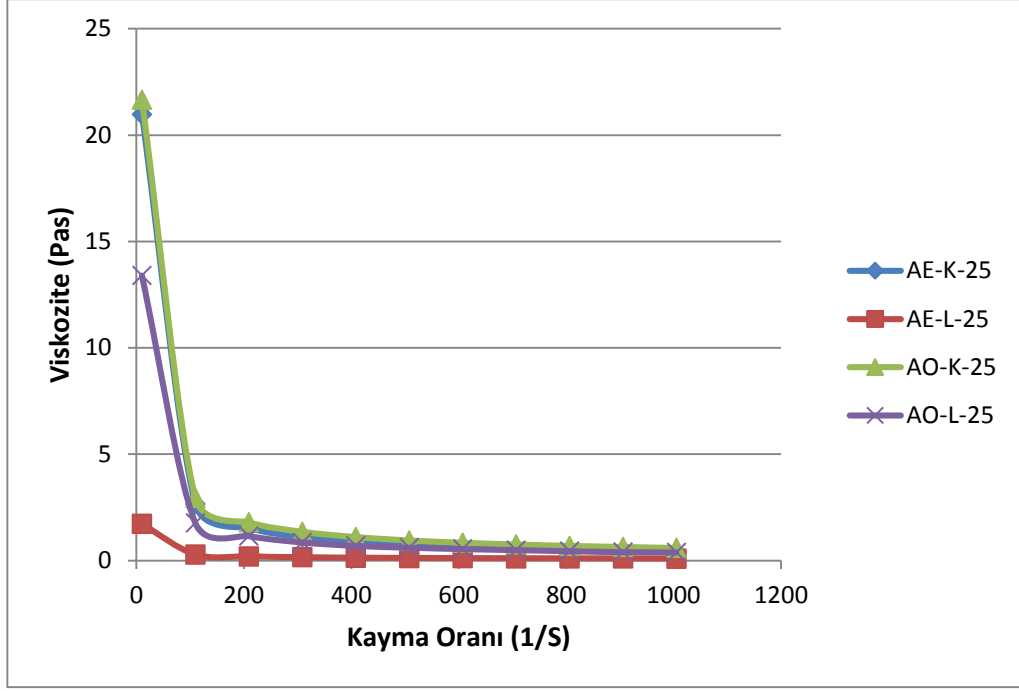
Jel formülasyonlarının reolojik olarak incelenmesi yöntem 2.2.6.2.3’de anlatıldığı gibi yapıldı. Şekil 21- 24’de jel formülasyonlarına ait 25 °C ve 32 °C’deki viskozite-kayma oranı ve kayma gerilimi- kayma oranı grafikleri gösterilmiştir.



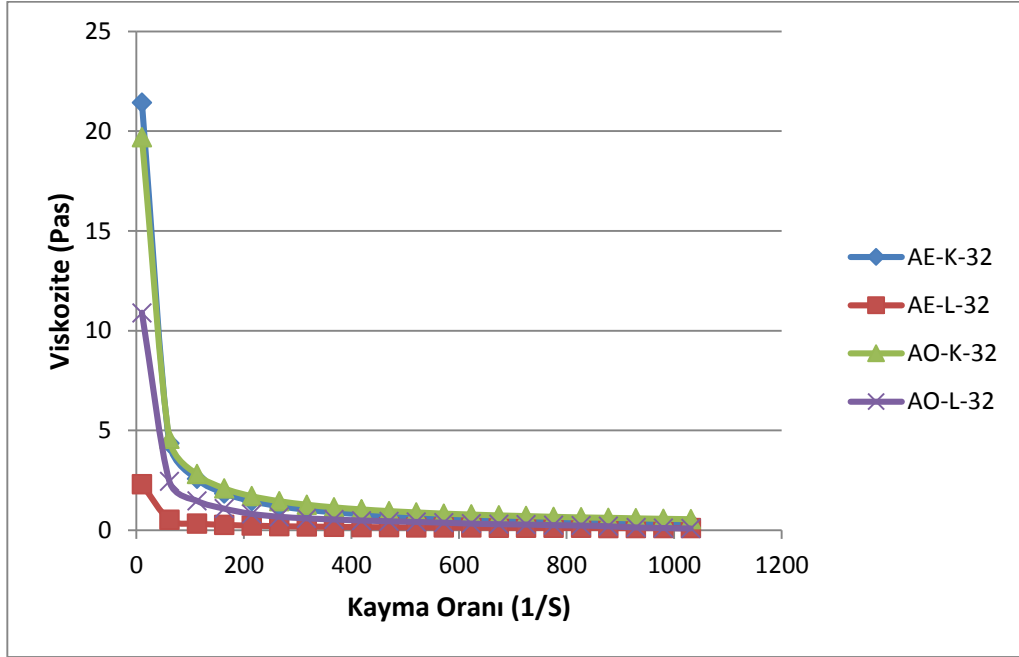
Şekil 21. Jel Formülasyonlarının 25 °C'deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği



Şekil 22. Jel Formülasyonlarının 32 °C'deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği



Şekil 23. Jel Formülasyonlarının 25 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği



Şekil 24. Jel Formülasyonlarının 32 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği

Jel formülasyonları üzerinde ayrıca yöntem 2.2.6.2.3'de anlatıldığı gibi 25 °C ve 32 °C'de osilasyon ölçümleri de yapıldı. Bu ölçümler sonucunda jellerin G' ve G''

değerleri, $\tan\delta$ ve η (viskozite) değerleri hesaplandı. Tablo 8-11’de jel formülasyonlarına ait hesaplanan parametrelerin belirli osilasyon frekanslarındaki değerleri verilmiştir.

Tablo 8. Jel formülasyonlarına ait G’ değerleri

Formülasyon	Sıcaklık (°C)	0.60 Hz	2.00 Hz	5.00 Hz	7.00 Hz	10.00 Hz
AE-K	25	215,166	229,066	242,366	246,766	249,266
	32	232,425	246,775	259,975	261,325	266,025
AE-L	25	33,676	37,48	40,993	40,713	41,876
	32	33,43	37,0766	40,296	39,38	41,693
AO-K	25	363,8	380,575	395,875	397,575	404,9
	32	366,55	383,5	398,6	396,025	402,325
AO-L	25	345,766	360,2	373,766	376,233	383,1
	32	340,8	355,05	368,4	367,925	375,25

Tablo 9. Jel formülasyonlarına ait G’’ değerleri

Formülasyon	Sıcaklık (°C)	0.60 Hz	2.00 Hz	5.00 Hz	7.00 Hz	10.00 Hz
AE-K	25	17,04	22,63	30,94	34,11	39,663
	32	17,175	22,46	29,87	32,342	35,837
AE-L	25	6,579	9,577	13,66	16,533	17,26
	32	6,238	9,098	12,76	15,566	14,93
AO-K	25	24,575	28,422	35,97	37,645	45,347
	32	24,695	28,127	34,827	36,09	40,125
AO-L	25	17,86	22,643	30,896	33,416	39,753
	32	19,097	22,355	30,502	31,78	37,522

Tablo 10. Jel formülasyonlarına ait tanδ değerleri

Formülasyon	Sıcaklık (°C)	0.60 Hz	2.00 Hz	5.00 Hz	7.00 Hz	10.00 Hz
AE-K	25	0,079	0,098	0,128	0,138	0,159
	32	0,073	0,091	0,115	0,123	0,134
AE-L	25	0,195	0,255	0,333	0,406	0,412
	32	0,187	0,247	0,318	0,397	0,360
AO-K	25	0,067	0,074	0,090	0,094	0,111
	32	0,067	0,073	0,087	0,091	0,099
AO-L	25	0,051	0,062	0,082	0,088	0,103
	32	0,056	0,062	0,082	0,086	0,101

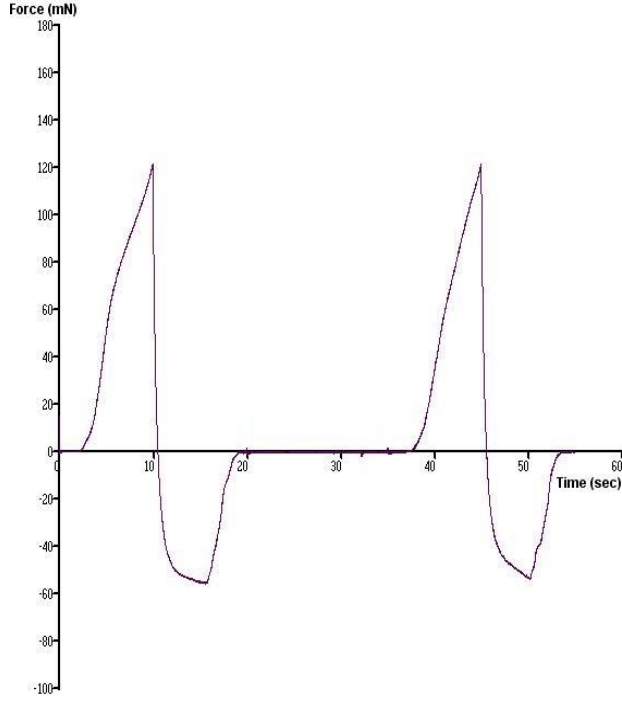
Tablo 11. Jel formülasyonlarına ait η değerleri

Formülasyon	Sıcaklık (°C)	0.60 Hz	2.00 Hz	5.00 Hz	7.00 Hz	10.00 Hz
AE-K	25	4,520	1,801	0,985	0,773	0,633
	32	4,555	1,787	0,950	0,735	0,571
AE-L	25	1,745	0,762	0,434	0,375	0,274
	32	1,654	0,724	0,406	0,354	0,237
AO-K	25	6,518	2,262	1,144	0,855	0,721
	32	6,551	2,238	1,108	0,821	0,638
AO-L	25	4,738	1,802	0,983	0,76	0,632
	32	5,066	1,779	0,971	0,722	0,597

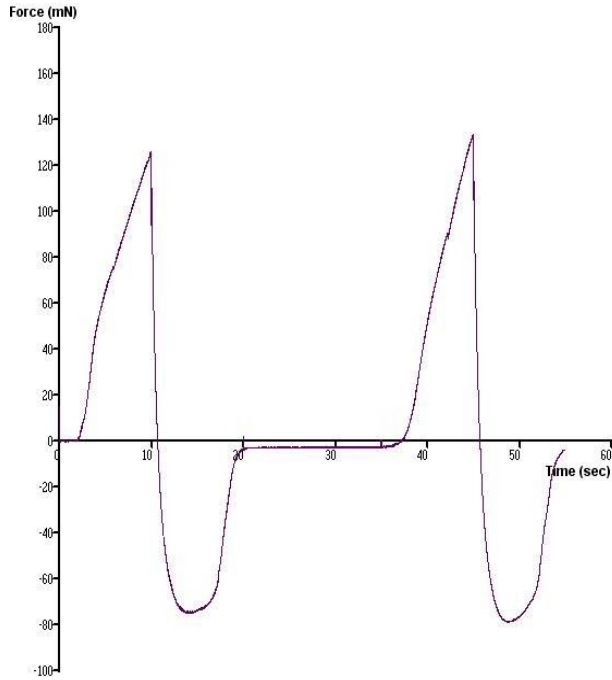
3.5.3 Jellerin Mekanik Özelliklerinin Tayinine Ait Bulgular

Jellerin mekanik özelliklerini tayin etmek için TA-XT Plus Texture analiz cihazı kullanılarak Yöntem 2.2.6.2.4’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Formülasyonlara ait TPA grafikleri Şekil 25-28’de gösterilmektedir. Bu çalışmalara ait grafiklerin

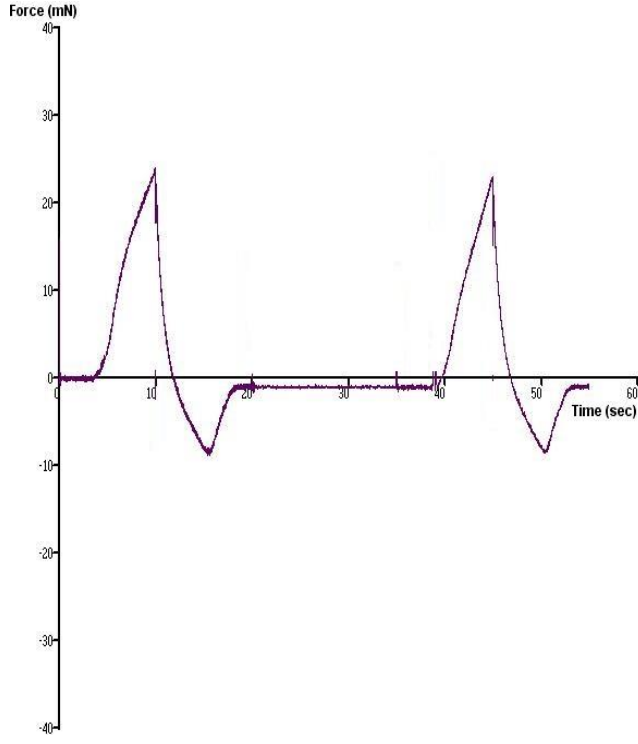
değerlendirilmesi ve gerekli hesaplamaların yapılması sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 12’de yer almaktadır.



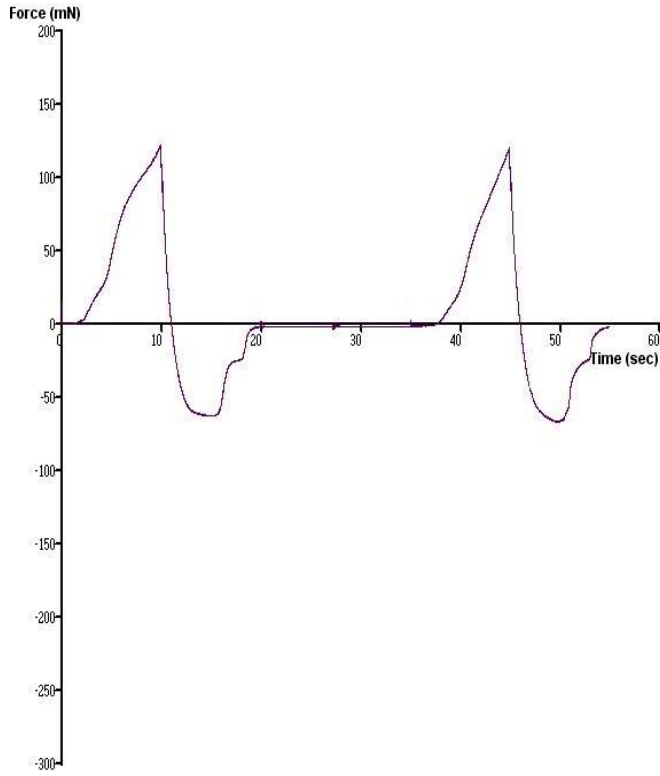
Şekil 25. AO-L Formülasyonuna Ait TPA Grafiği



Şekil 26. AO-K Formülasyonuna Ait TPA Grafiği



Şekil 27. AE-L Formülasyonuna Ait TPA Grafiği



Şekil 28. AE-K Formülasyonuna Ait TPA Grafiği

Tablo 12. Jellerin Mekanik Özelliklerine Ait Bulgular

Formülasyon	Sertlik (mN)±SS	Adeziflik (mN.mm)± SS	Koheziflik ±SS	Sıkıştırılabilirlik (mN.mm)±SS	Elastikiyet ±SS
AO-L	119,923± 0.002	331,282± 0.002	1,114± 0.003	517,635 ± 0.002	1,07± 0.001
AO-K	124,632± 0.003	488,481± 0.001	1,072± 0.005	612,693 ± 0.002	0,997± 0.002
AE-L	23,695± 0.001	32,753± 0.002	1,195± 0.002	93,005 ± 0.004	0,956± 0.001
AE-K	118,454± 0.001	341,527± 0.002	1,241± 0.004	572,56 ± 0.003	0,946± 0.001

3.5.4 Etkin Madde Miktar Tayinine Ait Bulgular

Yöntem 2.2.6.2.5’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo 13’de gösterilmektedir.

Tablo 13. Jel Formülasyonlarının etkin madde miktarı tayini

Formülasyon	AE-L	AE-K	AO-L	AO-K
Etkin Madde Miktarı	%99.4±0.3	%99.6±0.1	%99.8±0.2	%99.4±0.2

3.6 Formülasyonların Stabilité Çalışmalarına Ait Bulgular

Jel formülasyonlarının stabilite çalışmaları yöntem 2.2.6.3’de belirtildiği gibi çalışıldı. Jellerin stabilitesi, 25 °C sıcaklık-% 60 relatif rutubet koşullarında ve buzdolabında +4 °C’de 3 ay süre ile izlendi. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, formülasyonların belirtilen süreler içinde görünüşlerinde bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 14-16’da verilmiştir.

25 °C sıcaklık- % 60 relatif rutubet koşullarında stabilite için izlenen jel formülasyonlarının reoloji ve viskozite tayini 3. ayın sonunda tekrar yapıldı. Sonuçlar Şekil 29-32’de grafiklerle verilmiştir.

Tablo 14. Jel formülasyonlarının pH sonuçları

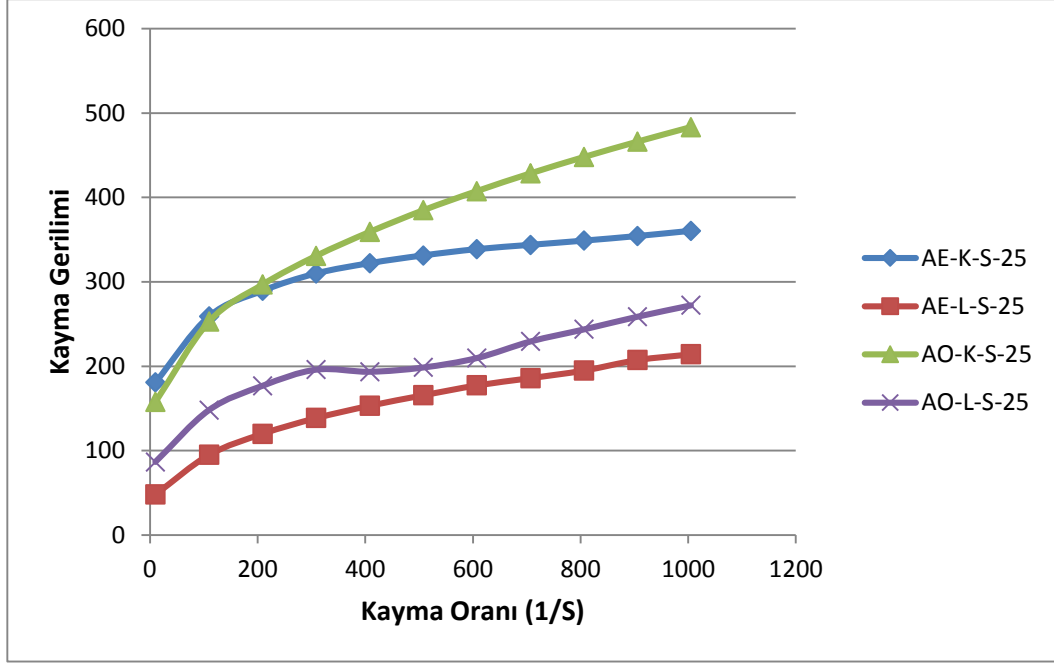
Formülasyon	pH		
	1. ay	2. ay	3. ay
AE-L	4.87±0.1	4.87±0.2	4.87±0.1
AE-K	4.76±0.2	4.76±0.3	4.76±0.1
AO-L	4.75±0.2	4.75±0.2	4.75±0.3
AO-K	4.66±0.1	4.66±0.1	4.66±0.1

Tablo 15. Jel formülasyonlarının 25 °C'deki etkin madde miktarları

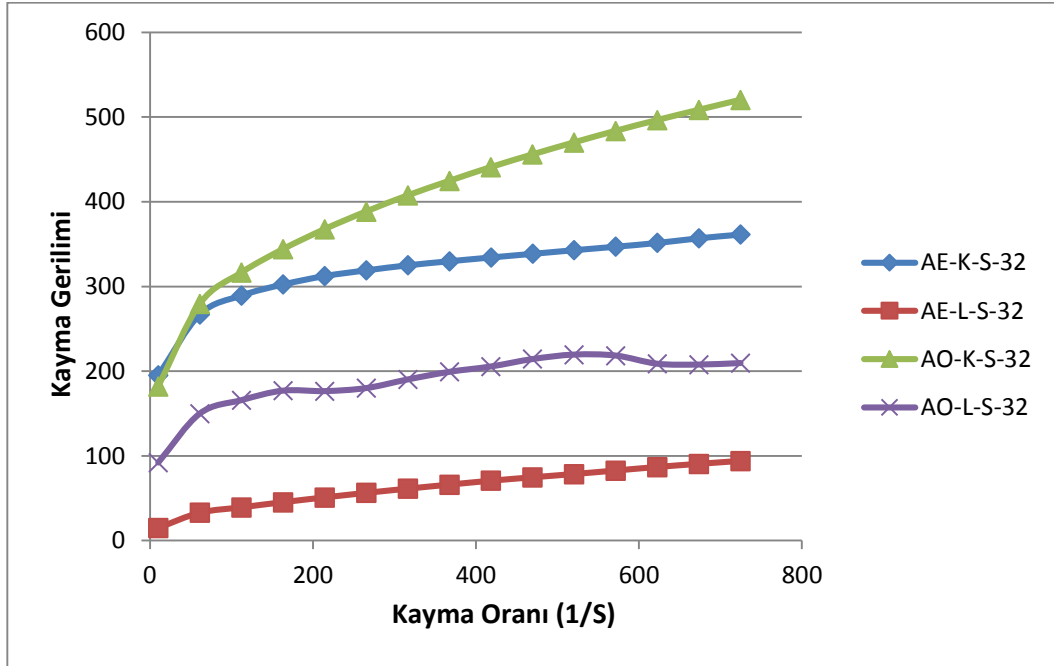
Formülasyon	% Etkin Madde (25 °C)		
	1. ay	2. ay	3. ay
AE-L	%98.7±0.3	%98.5±0.4	%98.4±0.2
AE-K	%98.5±0.6	%98.3±0.5	%98.1±0.5
AO-L	%98.4±0.2	%98.4±0.2	%98.3±0.4
AO-K	%98.2±0.6	%98.2±0.3	%98.1±0.2

Tablo 16. Jel formülasyonlarının buzdolabındaki (+4 °C) etkin madde miktarları

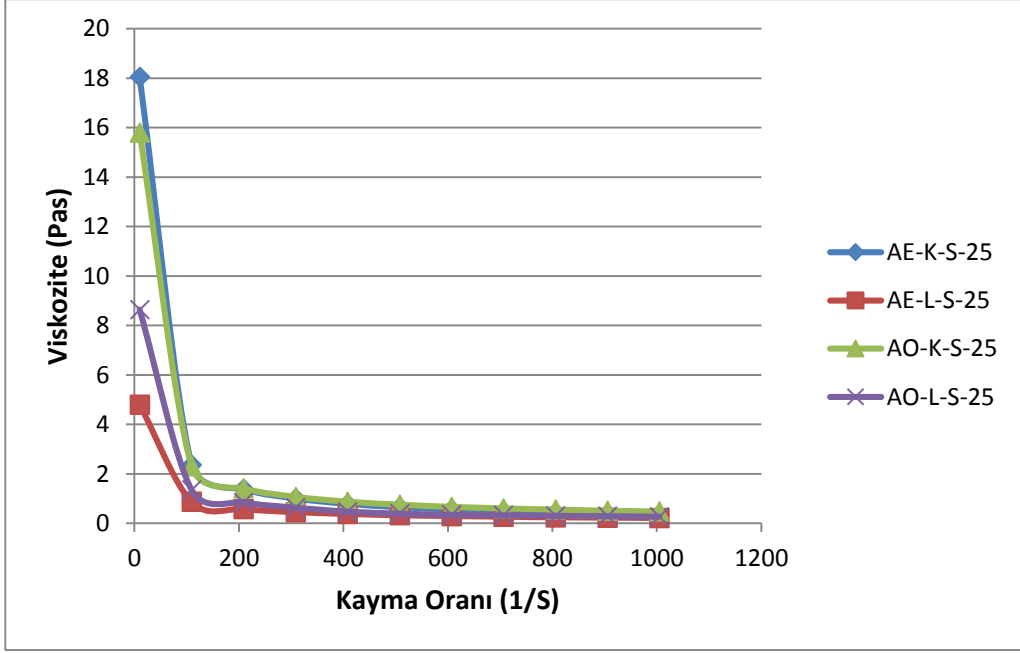
Formülasyon	% Etkin Madde (Buzdolabı)		
	1. ay	2. ay	3. ay
AE-L	%99.8±0.2	%99.6±0.4	%99.5±0.3
AE-K	%99.7±0.4	%99.4±0.1	%99.1±0.5
AO-L	%99.5±0.6	%99.3±0.6	%99.3±0.4
AO-K	%99.7±0.3	%99.6±0.5	%99.4±0.2



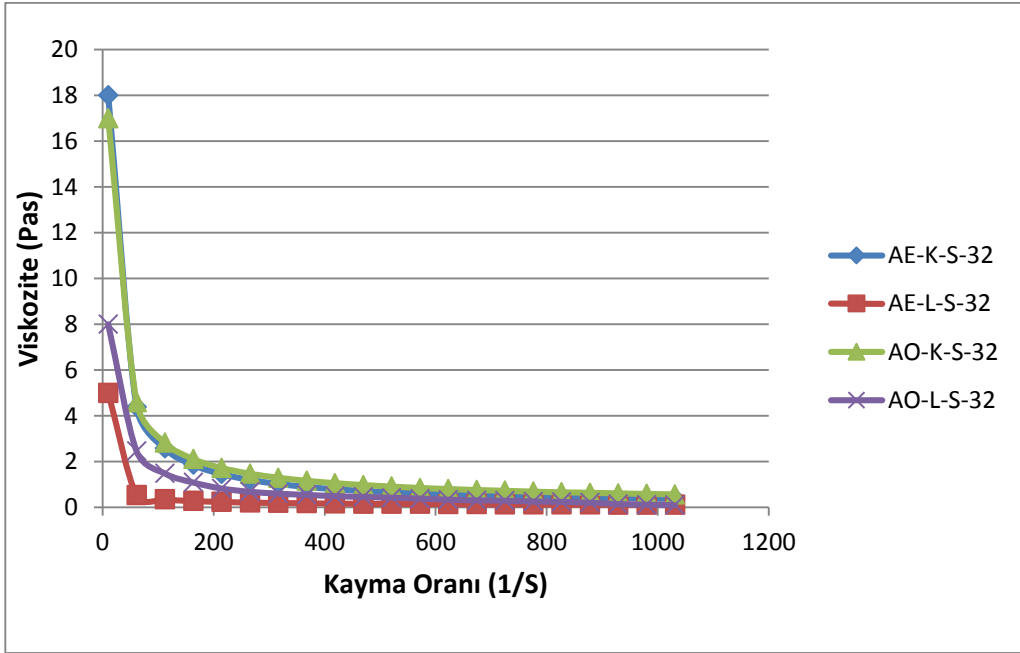
Şekil 29. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 25 °C’deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği



Şekil 30. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 32 °C’deki kayma gerilimi-kayma oranı grafiği



Şekil 31. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 25 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği

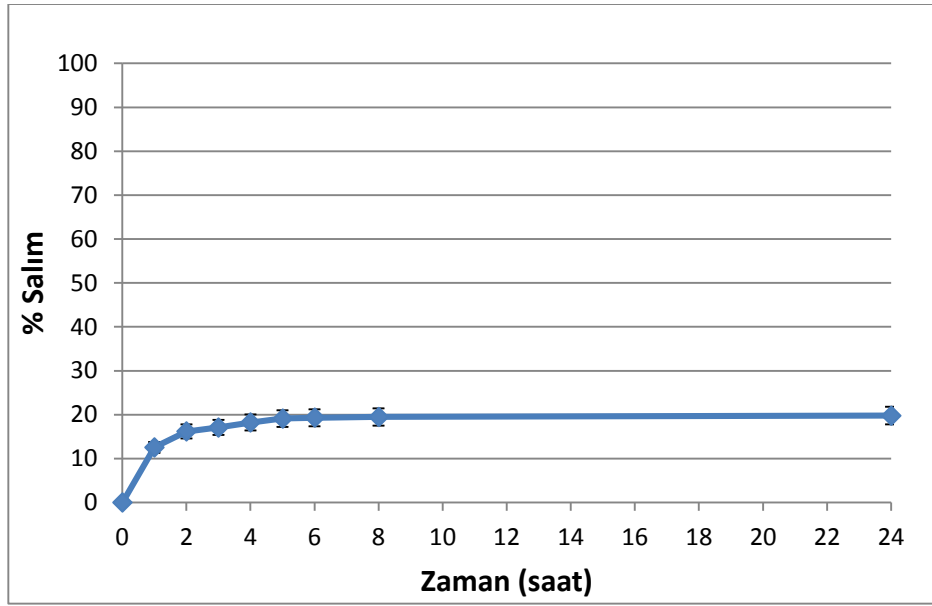


Şekil 32. Jel Formülasyonlarının 3. ayın sonunda, 32 °C'deki viskozite-kayma oranı grafiği

3.7 In Vitro Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

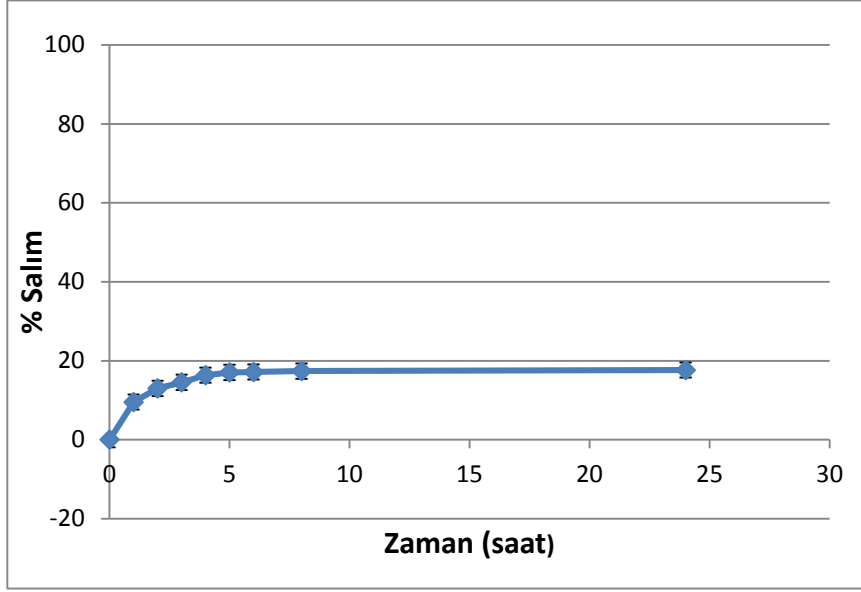
Yöntem 2.2.7’da anlatıldığı şekilde salım çalışması yapıldı. YBSK ile edilen pil altı alan değerleri standart doğru denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar bulundu. 24 saatin sonunda AO-L, AO-K, AE-L, AE-K formülasyonlarından sırasıyla 99 µg, 88.3 µg, 403 µg ve 234.8 µg etkin madde salınmıştır. Formülasyonların 500 µg/g konsantrasyonunda etkin madde içermesine bağlı olarak hesaplanan yüzde salım sonuçlarına göre elde edilen grafikler aşağıdadır (Şekil 33-36).

Astaksantin %5 Oleoresin Lipojel (AO-L)



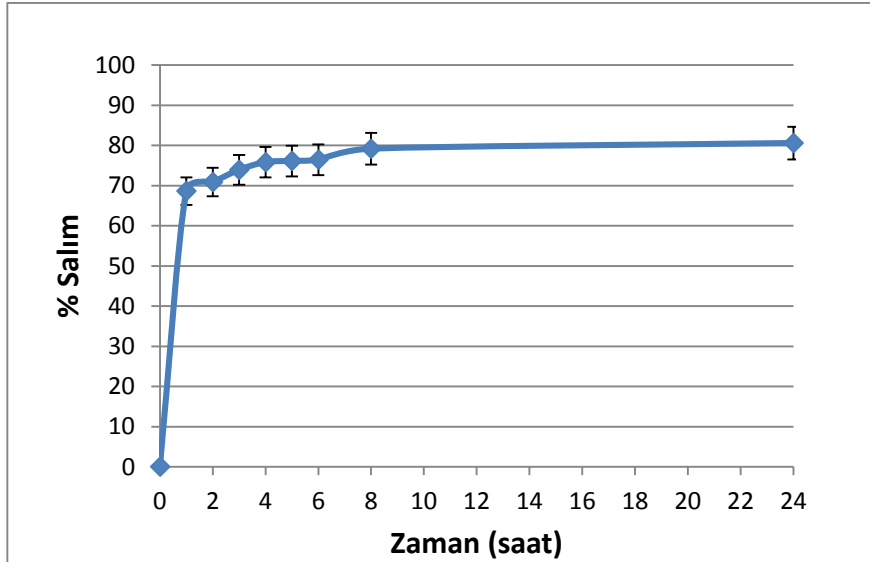
Şekil 33. Astaksantin %5 Oleoresin Lipojele Ait % Salım Grafiği

Astaksantin %5 Oleoresin Karbopol Jel (AO-K)



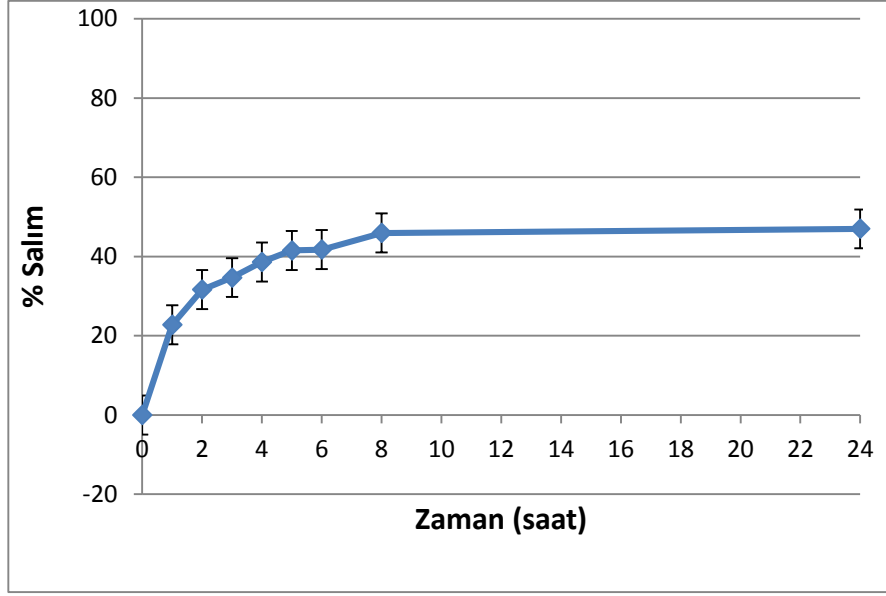
Şekil 34. Astaksantin %5 Oleoresin Karbopol Jele Ait % Salım Grafiği

Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Lipojel (AE-L)



Şekil 35. Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Lipojele Ait % Salım Grafiği

Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Karbopol jel (AE-K)

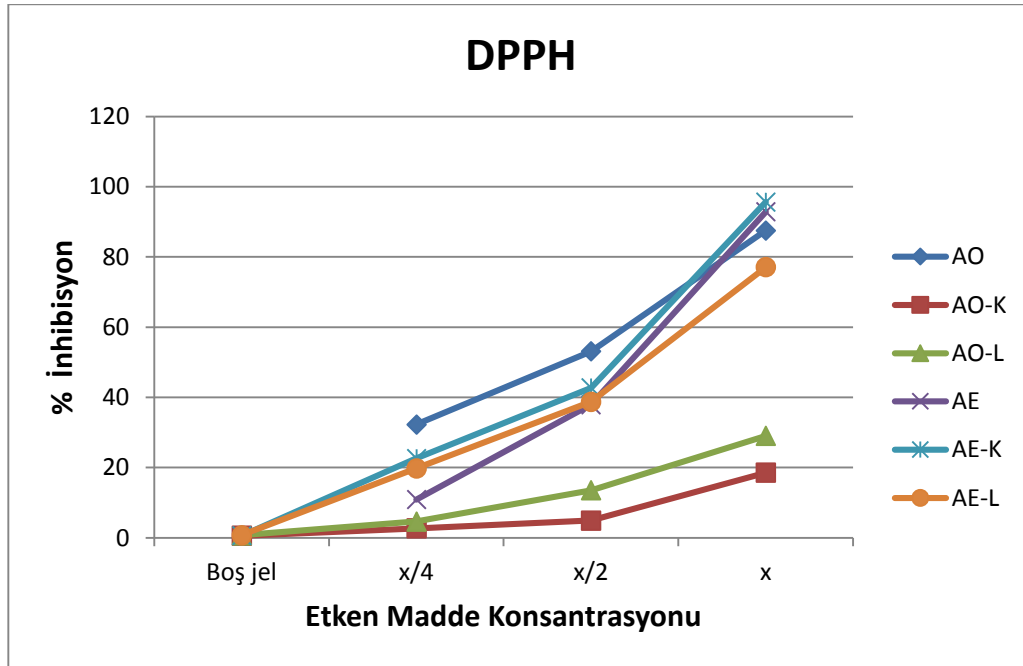


Şekil 36. Astaksantin İçeren Alg Ekstresi Karbopol Jele Ait % Salım Grafiği

3.8 Antioksidan Aktivite Tayini Çalışmalarına Ait Bulgular

3.8.1 Serbest Radikal Süpürme Kapasitesi Tayini

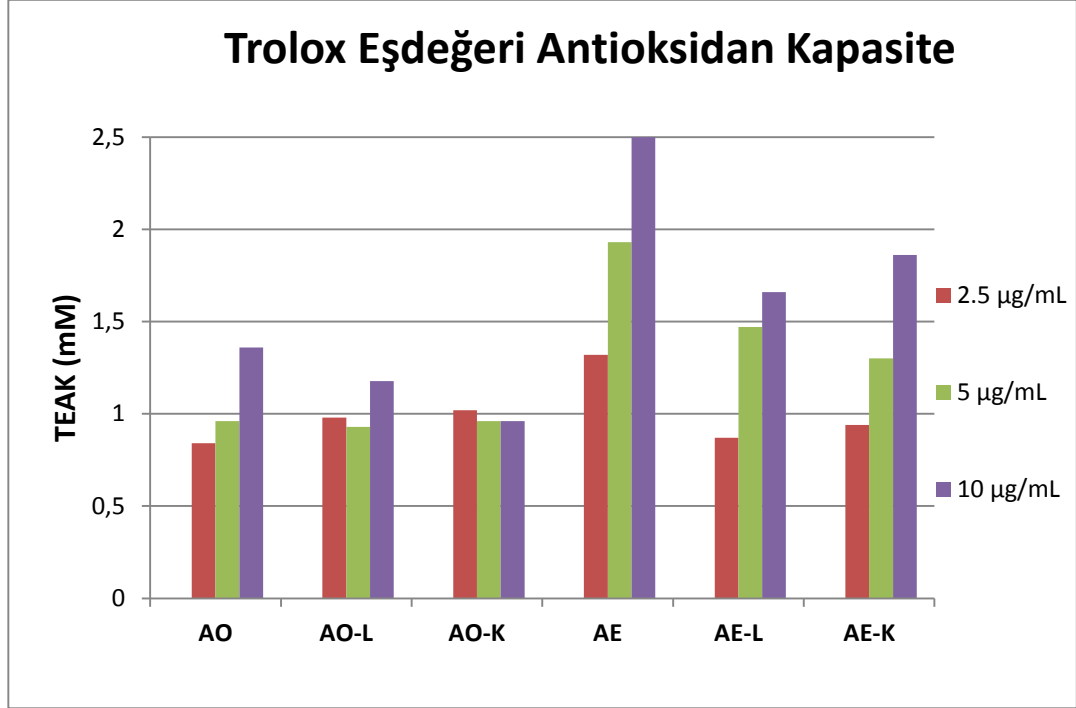
Yöntem 2.2.8.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte gösterilmektedir. (Şekil 37).



Şekil 37. Serbest radikal süpürme kapasitesi tayini bulguları

3.8.2 Total Antioksidan Kapasite (TAK) Tayini Yöntemi

Yöntem 2.2.8.2’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte gösterilmektedir. (Şekil 38).

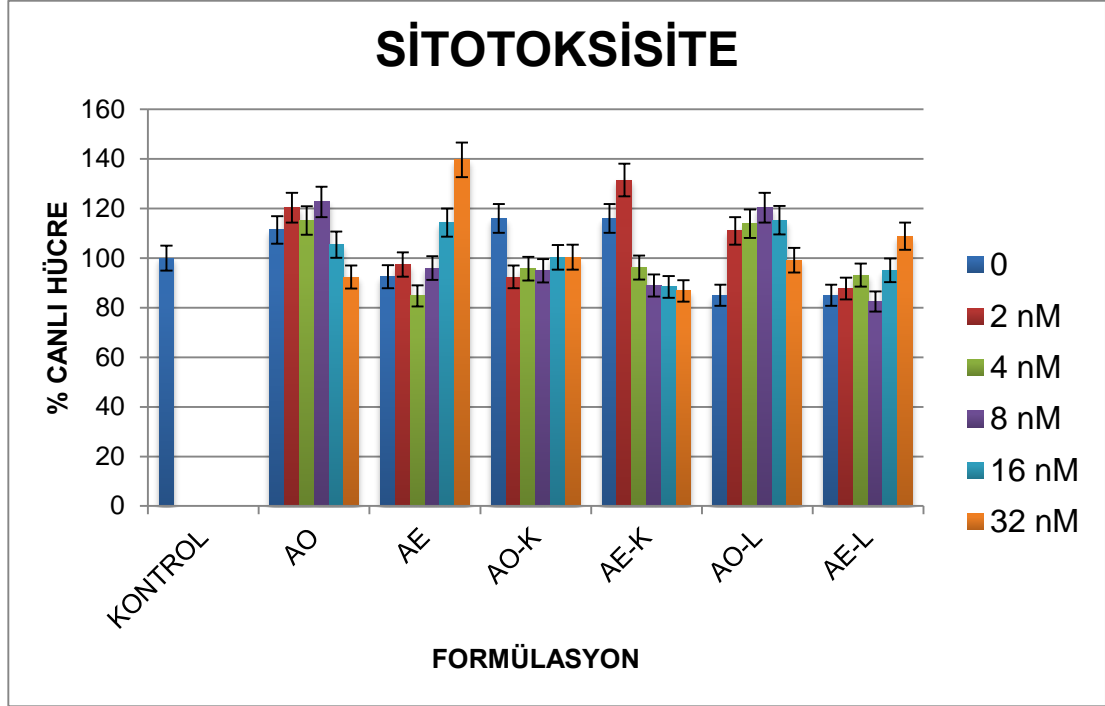


Şekil 38. Total antioksidan kapasite tayini bulguları

3.9 Hücre Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

3.9.1 Sitotoksosite Testine Ait Bulgular

Yöntem 2.2.9.1’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki grafikte gösterilmektedir. (Şekil 39).



Şekil 39. Sitotoksosite Bulguları

IV. BÖLÜM

TARTIŞMA

Deri yaşlanması ciltte yapısal ve moleküler değişiklikler ile birlikte gelişen fonksiyonel bir bozulma durumudur (115). Zamana bağlı olarak vücutta gözlenen yapısal bozulmalar ve değişikliklerden (intrensek- gerçek yaşlanma) kaynaklanabildiği gibi pek çok çevresel faktör de bu süreçte etkili olmaktadır (ekstrensek- fotoyaşlanma). Zamanla oluşan yaşlanma belirtilerinin üzerine UV ışınlarının etkisiyle oluşan fotoyaşlanma belirtileri de eklendiğinde, klinik ve kozmetik açıdan bir deri problemi ortaya çıkmaktadır. Deride yaşlanma ile kırışıklık, lekeler (pigmentasyon), gevşeklik, elastikiyet kaybı, kuruluk gibi pek çok gözlenebilir klinik değişiklikler oluşur (38). Bu değişikliklerin oluşuktan sonra giderilmesi uzun süreli tedaviler gerektirmektedir. Bu nedenle yaşlanma belirtilerinin oluşmasını geciktirici ve önleyici çözümlerin geliştirilmesi çok uzun yıllardır kozmetolojinin en önemli konusu olmuştur.

Deri yaşlanmasına karşı kozmetik endüstrisinde vitaminler, alfa hidroksi asitler (AHA'lar), fitoterapötikler, biyofaktörler, U.V. filtre ediciler, serbest radikal yakalayıcılar gibi pek çok etkin madde kullanılmaktadır (107). Antioksidan maddeler bu amaçla kullanılan en önemli etkin maddeler arasında sayılmaktadır. Bunun nedeni yaşlanma sürecini ilk kez açıklayan Harman tarafından önerilen (1956) ve günümüze kadar pek çok klinik bulgu ile desteklenmiş olan *serbest radikal teorisi'dir* (56). Bu teoriye göre yaşlanma vücutta oksidatif stres ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizliğin bir sonucudur. Organizma yaşamsal faaliyetlerini yürütürken serbest radikaller üretir. Vücutta bu saldırılara karşı koruma sağlayan maddeler üretilmekte ve besinlerden alınan bazı vitaminler ile bazı fitokimyasallar serbest radikalleri zararsızlaştırabilmektedir. Serbest radikal hasarına

bu şekilde karşı koyan maddelere antioksidan maddeler denir. Normalde vücut bir ölçüde serbest radikal hasarına karşı koyar ama yaşlanma ile antioksidan savunma sistemlerindeki azalmaya ve serbest radikal oluşumundaki artmaya bağlı olarak bu denge serbest radikallerin lehine kaymakta ve hücrelerde kalıcı hasarlar meydana gelmektedir. Antioksidan maddelerin bu hasarı durdurabildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

Bu amaçla tez çalışmamızda deri yaşlanmasına karşı kullanılmak üzere etkin madde olarak astaksantin seçilmiştir. Astaksantin bazı eklem bacaklılar, balıklar ve alglerden elde edilen kırmızı-turuncu renkli, lipofilik bir karotenoid pigmentidir. Astaksantin, antioksidan özellikleriyle bilinen E vitamini ve β -karoten'den daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında astaksantin içeren topikal bir formülasyona rastlanmamıştır. Astaksantin içeren ve çeşitli amaçlarla kullanılan gıda takviyeleri ve oral formülasyonlar bulunmaktadır. Hazırlanan astaksantin içeren jel formülasyonları ile güçlü antioksidan aktivite sayesinde deri üzerinde serbest radikal hasarlarının önlenmesi ve yaşlanma karşıtı alanda yenilikçi bir yaklaşım önerilmesi amaçlanmıştır (22,54,97,145,168).

Bu çalışmada astaksantin %5 oleoresin ve astaksantin içeren alg ekstresi kullanılarak lipojel ve karbopol jel formülasyonları hazırlanmıştır.

Çalışmada önce etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri incelenmiş, astaksantin IR spektrumunda kimyasal yapıya bağlı olan karakteristik piklerin literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 15) (20).

Astaksantin miktar tayini çalışmaları için YBSK yöntemi kullanılmıştır. Çalışmalarda öncelikle λ_{max} değeri, astaksantin %5 oleoresin ve astaksantin içeren

alg ekstresi için 480 nm olarak bulunmuştur (Şekil 16 ve 17). Bulunan λ_{\max} değerinin literatürde belirtilen dalga boylarına uygun olduğu görülmüştür (61).

Miktar tayini yönteminin geçerliliğinin kanıtlanması için, ICH kriterleri esas alınarak analitik yöntem validasyonu çalışmaları yapıldı. Validasyon için yapılan çalışmalarda doğrusallık, doğruluk ve geri elde edilebilirlik, kesinlik (tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik), özgünlük (seçicilik), stabilite, teşhis ve tayin sınırı parametreleri incelendi.

Doğrusallık çalışmalarında, çalışılan konsantrasyon aralığında konsantrasyon-eğri altı alan ilişkisinin doğrusal olduğu görüldü. Standart doğru denklemi $y=212,5x-18,26$ olarak bulundu. Bu doğrusallığın göstergesi olan determinasyon katsayısı (R^2), astaksantin standart doğru denklemi için, YBSK yöntemi ile 0.999 olarak bulundu (Şekil 18).

Doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmaları üç farklı konsantrasyonda gerçekleştirildi. Yapılan çalışmanın sonucunda, elde edilen değerlerle hesaplanan % geri elde değerlerinin ortalaması ve bu dağılımın standart sapması yöntemin doğruluğunu onaylamaktadır (Tablo 2).

Kesinlik tayininde, etkin maddenin standart doğru çizimlerinde kullanılan ortamlarından hazırlanan herhangi bir konsantrasyondaki çözeltisi seçilerek tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik parametreleri uygulandı. Varyasyon katsayılarının %2'nin altında olması yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır (Tablo 3 ve 4).

Özgünlüğün saptanabilmesi için; çalışmada kullanılan polimerlerin ve yardımcı maddelerin, 400-800 nm dalga boyları arasında spektrumları incelendi. Astaksantin maksimum absorban verdiği dalga boyunda, yardımcı maddelerin

herhangi bir absorbans vermedikleri görüldü ve yöntemin etkin maddeye özgü olduğu bulundu (Şekil 19 ve 20).

Stabilite çalışmalarında ise, etkin maddenin çözünme ortamında 48 saat boyunca stabilitesi incelendi ve elde edilen konsantrasyon değerlerinde anlamlı bir değişiklik görülmedi. Bunun sonucu olarak, astaksantin bu süre boyunca stabil olduğu sonucuna varıldı (Tablo 5).

Teşhis sınırı, sinyal/gürültü oranının 3.3 katı olarak kabul edilmektedir. Tayin sınırı, sinyal/gürültü oranı 10 ile çarpılarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada LOD 3.3×10^{-4} µg/mL ve LOQ 10^{-3} µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Astaksantin içeren alg ekstresinin çözünürlük çalışması yöntem 2.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Üç paralel örnekten elde edilen konsantrasyonların ortalama değeri 56 µg/mL olarak bulunmuştur. Astaksantin içeren alg ekstresindeki astaksantin miktarını hesaplamak amacıyla yöntem 2.2.5'te anlatıldığı gibi çalışıldı. YBSK yöntemi ile elde edilen eğri altı alanlar standart doğru denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar bulundu. Astaksantin içeren alg ekstresindeki yüzde astaksantin miktarı %0.8 olarak tespit edilmiştir (Tablo 6).

Formülasyon çalışmalarında Astaksantin %5 oleoresin ve Astaksantin içeren alg ekstresi kullanılarak AO-L ve AE-L lipojelleri ile AO-K ve AE-K karbopol jelleri hazırlanmıştır.

Hazırlanan jel formülasyonları üzerinde; makroskobik incelemeler, pH, reoloji ve viskozite ölçümleri, mekanik karakterizasyon, etkin madde miktar tayini ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. Hazırlanan jellerin mor ve kırmızı renkte, homojen ve cilde uygulamak için uygun pH değerlerinde olduğu bulunmuştur (4.52-4.87).

Hazırlanan jel formülasyonlarının reoloji ve viskozite tayinleri yapılmıştır. Jel formülasyonlarına ait 25 °C ve 32 °C'deki viskozite-kayma oranı ve kayma gerilimi-kayma oranı grafikleri Şekil 21-24'de gösterilmiştir. Grafiklerde görüldüğü gibi, akışın başlayabilmesi için bir eşik değeri vardır. Eşik değeri aşıldıktan sonra Newton olmayan akış tipi görülmektedir. Bu nedenle formülasyonların plastik akış tiplerinden Casson akışı gösterdikleri bulunmuştur (170).

Jel formülasyonlarında osilasyon ölçümleri 25 °C ve 32 °C'de yapılmış ve faz açısı (δ), elastik modül (G') viskoz modül (G'') ve dinamik viskozite (η) değerleri hesaplanmıştır.

Osilasyon çalışmaları, belli bir strese maruz kalan jel formülasyonunun viskoelastik özellikleri hakkında bilgi verir (42). Yüksek elastikiyet özellikleri formülasyonun uygulama bölgesindeki kalış süresini arttırarak kontrollü ve uzun süreli bir salım sağlar (5,6). Elastik modül saklı olan ve deformasyondan sonra sistemin eski haline dönmesi için gerekli olan enerjiyi ölçer. Böylece sistemin elastik özellikleri hakkında bilgi verir. Çözeltilerde elastik modül düşük bir değer iken sistem jelleştikçe elastik modül değeri de artmaktadır. Osilasyon uygulamasında iki tane dinamik modül değeri elde edilir. Bunlardan biri elastikliği ölçen G' , elastik modül, bir diğeri de viskozite komponenti olan G'' viskoz modüldür. Jel sistemlerin katı tipi mekanik özellikler göstermesi gerektiği için $G' > G''$ olması gerekmektedir (63).

Tablo 8 ve 9'da farklı frekanslarda ölçülen G' ve G'' değerleri gösterilmiştir. Bu ölçümlere göre AE-L, AE-K, AO-L ve AO-K formülasyonlarının her iki sıcaklıktaki G' ve G'' değerlerinin ölçülen frekanslardan bağımsız olduğu görülmüştür. Bu formülasyonlar jel tipi mekanik spektrumlar oluşturmuşlardır ($G' > G''$).

Faz açısı değeri ($\tan \delta = G''/G'$), sistemin mekanik özelliklerini ifade eden bir terimdir. Katı tipi özellik gösteren sistemlerde bu değer birden küçük, sıvı tipi özellik gösteren sistemlerde ise birden büyük olması gerekmektedir. Yani $\tan \delta$ küçüldükçe sistemin elastikliği artar, viskoz özellikleri azalır (26,63). Hazırlanan tüm jel formülasyonlarının her iki sıcaklıktaki ölçümlerinde bu değer birden küçük bulunmuştur (Tablo 10).

Jellerin mekanik özelliklerini tayin etmek için, Stable Micro System Texture Analyser cihazı kullanılarak TPA analizleri yapılmıştır. Sistemin yazılımından elde edilen güç-zaman eğrisi kullanılarak jellerin sertliği, adezifliği, kohezifliği, elastikiyeti ve sıkıştırılabilirliği hesaplanmıştır. Topikal formülasyonların rahatlıkla bulunduğu kaptan çıkarılması, uygulama bölgesine sürülebilmesi, uygulama bölgesinde istenilen sürede kalabilmesi ve uygun viskozluk değerinde olması istenmektedir (68). TPA ile sistemin bu özellikleri belirlenebilmektedir. TPA analizi sonucu elde edilen sertlik, sıkıştırılabilirlik, adezyon, kohezyon ve elastikiyet değerleri Tablo 12'de gösterilmiştir. Sertlik, jellerin uygulama bölgesine sürülebilirliğini ifade etmektedir. Sıkıştırılabilirlik değeri, jelin bulunduğu kaptan çıkartılabilirlik özelliğini göstermektedir. Bu iki özellik sistemin baskı altındaki deformasyonunu ifade etmektedir (13). Sistemin bulunduğu kaptan çıkarılabilirliği ve kolay uygulanabilmesi için sertlik ve sıkıştırılabilirlik değerlerinin düşük olması gerekmektedir. Bu değerler sistemdeki polimer konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. Adeziflik, biyoadezyon ile bağlantılıdır. Cihazın probu ile jel arasındaki adezyon özelliğini ifade etmektedir. Kohezyon, jel moleküllerinin kendi aralarındaki bağların kopması için gerekli olan işi ifade etmektedir. Elastikiyet ise deforme olmuş sistemin eski haline dönme yeteneğini göstermektedir (68).

Çalışmamızda, en yüksek sertlik, adeziflik ve sıkıştırılabilirlik değeri, astaksantin %5 oleoresin karbopol jelde bulunmuştur. En yüksek koheziflik değeri astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan karbopol jelde, en yüksek elastikiyet değeri ise astaksantin %5 oleoresin lipojelde bulunmuştur. En düşük sertlik, adeziflik ve sıkıştırılabilirlik değeri astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan lipojelde bulunmuştur. Sertlik ve sıkıştırılabilirlik değeri düşük olduğu için astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan lipojel (AE-L), sistemin bulunduğu kaptan kolay çıkarılabilmesi ve kolay uygulanabilmesi bakımından ön plana çıkmaktadır. En düşük koheziflik değeri astaksantin %5 oleoresin karbopol jelde bulunmuştur, en düşük elastikiyet değeri ise astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan karbopol jelde bulunmuştur (Tablo 12).

Jel formülasyonlarının hazırlanmaları aşamasında meydana gelebilecek etkin madde kaybını belirlemek amacıyla etkin madde miktar tayini yapılmıştır. Tablo 13'de görüldüğü gibi etkin madde yüksek oranlarda formülasyonlardan geri elde edilmiştir.

Jellerin stabilitesi, 25 °C sıcaklık - % 60 relatif rutubet koşullarında ve buzdolabında +4 °C'de 3 ay süre ile izlenmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, formülasyonların belirtilen süreler içinde görünüşlerinde, pH değerlerinde ve etkin madde miktarlarında anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir (Tablo 14-16). Jellerin reoloji ve viskozite tayini çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında da anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 29-32). Bu nedenle jellerin stabil olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmada, astaksantin ile hazırlanan jellerden etkin maddenin salımı *in-vitro* salım deneyi ile incelenmiştir. Astaksantin %5 oleoresin ile hazırlanan lipojel ve karbopol jellerin ilk 5 saatten sonra salım yüzdelerinin aynı kaldığı görülmüştür.

Astaksantin %5 oleoresin lipojel 5. Saatin sonunda %19 oranında etkin maddeyi açığa çıkarırken, astaksantin %5 oleoresin karbopol jel ise 5. Saatin sonunda %17 oranında etkin maddeyi açığa çıkarmıştır. Astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan lipojel, 8. saatte etkin maddenin %79'unu açığa çıkarmış, 8. ve 24. saatler arasında salım yüzdesinde sadece %1'lik değişim olmuştur. Astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan karbopol jel, 8. saatte etkin maddenin %45'ini açığa çıkarmış, 8. ve 24. saatler arasında salım yüzdesinde sadece %1'lik değişim olmuştur (Şekil 33-36). Astaksantin %5 oleoresinle hazırlanan formülasyonlardan astaksantin salımı, astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan formülasyonlara göre daha azdır. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Astaksantin %5 oleoresinle hazırlanan formülasyonlardan etkin madde salımının düşük olmasına içeriğindeki reçinenin sebep olduğu ve etkin maddeyi tutarak salımına engel olduğu düşünülmektedir. Bu sonuçlara bakılarak astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan lipojelin en yüksek salım yüzdesine sahip olduğu ve bu bakımdan diğer formülasyonlardan üstün olduğu görülmüştür.

Antioksidan aktivite tayini çalışmalarında; serbest radikal süpürme kapasitesi tayini ve total antioksidan kapasite tayini yapılmıştır. Her iki çalışmada da en yüksek antioksidan aktivite AE-K formülasyonunda bulunmuştur. İkinci en yüksek antioksidan aktivite AE-L formülasyonuna aittir. Formülasyonlar arasında en düşük antioksidan aktivite, her iki yöntemde de, AO-K formülasyonunda saptanmıştır. Ayrıca formülasyonların güçlü antioksidan özelliğini göstermek amacıyla jel formülasyonlarının konsantrasyonları $\frac{1}{2}$ ve $\frac{1}{4}$ oranlarına düşürülerek ölçümler tekrarlanmıştır. Düşük konsantrasyonlar dahil tüm sonuçlara bakılarak formülasyonların güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Hazırlanan jel formülasyonlarının hücelere zarar verip vermediğini kontrol etme amaçlı olarak yapılan sitotoksisite testinde, jel formülasyonları canlı hücelere uygulanmıştır. Sitotoksisite testi çalışmalarının sonunda, % canlı hücre sayısında önemli bir azalma görülmemiştir. Formülasyonların uygulandığı % canlı hücre sayılarında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Hatta bazı konsantrasyonlarda formülasyonların % canlı hücre sayısını arttırdığı gözlenmiştir (Şekil 39).

SONUÇ

Çalışmamızda astaksantin içeren, antioksidan aktiviteye sahip topikal formülasyonların hazırlanması hedeflenmiştir. Astaksantin %5 oleoresin ve astaksantin içeren alg ekstresi kullanılarak formülasyon çalışmaları yapılmıştır.

Bu doğrultuda astaksantin içeren lipojel ve karbopol jel formülasyonları çalışmamızda ilk defa hazırlanmıştır. Bu açıdan çalışmamızın literatüre yenilik getireceği düşünülmektedir.

Hazırlanan astaksantin içeren jel formülasyonları ile güçlü antioksidan aktivite sayesinde deri üzerinde serbest radikal hasarlarının önlenmesi ve yaşlanma karşıtı alanda yenilikçi bir yaklaşım önerilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç olarak; yaptığımız çalışmalar, in vitro salım deneyi ve antioksidan aktivite tayini çalışmaları gözönüne alındığında, açığa çıkan etkin madde miktarı, güçlü antioksidan aktivite göstermesi, formülasyonun bulunduğu kaptan kolay çıkarılabilmesi ve kolay uygulanabilmesi nedeniyle astaksantin içeren alg ekstresi ile hazırlanan lipojel (AE-L) formülasyonu tarafımızdan önerilmektedir. Formülasyonun piyasadaki preparatlara önemli bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

V. BÖLÜM

ÖZET

ASTAKSANTİNİN ANTIOKSIDAN ETKİLİ TOPIKAL FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI

Yaşlılık; genetik, yaşam şekli, kronik hastalık gibi değişkenleri içeren karışık bir süreçtir. Son yıllarda yaşlanma ile ilgili araştırmalarda reaktif oksijen türleri üzerinde daha fazla durulmakta ve yaşlanma sürecinde bu radikallerin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Serbest radikaller grubundan reaktif oksijen türleri oksidatif stres oluşumuna neden olurlar. Antioksidan maddeler; serbest oksijen türleri ile reaksiyona girip onları etkisiz hale getirirler. Astaksantin de güçlü bir antioksidandır. Astaksantin bazı eklem bacaklılar, balıklar ve alglerden elde edilen kırmızı-turuncu renkli, lipofilik bir karotenoid pigmentidir. Astaksantin, antioksidan özellikleriyle bilinen E vitamini ve β -karotenden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmamızda serbest radikal hasarının önlenmesi amacıyla astaksantin içeren jel formülasyonları hazırlandı. Hazırlanan formülasyonların karakterizasyon çalışmaları ve 25 °C sıcaklık - % 60 relatif rutubet koşullarında ve buzdolabında +4 °C'de 3 aylık stabilite çalışmaları yapıldı. Formülasyonların in-vitro salım deneyleri, etkinlik tayinleri için antioksidan aktivite tayini ve toksisite testi için hücre kültürü çalışmaları yapıldı.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında, güçlü antioksidan aktiviteye sahip astaksantin içeren, stabil ve güvenilir, yaşlanma karşıtı etkinlik gösteren, yenilikçi bir topikal formülasyon geliştirilmiştir.

ABSTRACT

DESIGN OF TOPICAL FORMULATIONS OF ASTAXANTHIN HAS ANTIOXIDANT ACTIVITY

Ageing; is a complicated process containing variables such as genetic, lifestyle, chronic diseases. In recent years, reactive oxygen species are more emphasized in researches related to aging and it has been suggested that these radicals play an important role in the aging process. Reactive oxygen species from the free radicals group cause the formation of oxidative stress. Antioxidant agents react with free oxygen species and inactivate them. Astaxanthin is also a powerful antioxidant. Astaxanthin is a red-orange color, lipophilic carotenoid pigment obtained from some arthropods, fish and algae. It has been reported that astaxanthin has higher antioxidant activity than vitamin E and beta-carotene which is known with antioxidant properties.

In our study, gel formulations containing astaxanthin were prepared for the prevention of free radical damage. Characterization studies of the formulations prepared were conducted and as a result of these studies, the formulations were kept at 25° C - 60% relative humidity conditions in the stability cabin and 3-month stability studies were also performed in the refrigerator. In-vitro release experiments of the formulations, antioxidant activity assay for the determination of efficiency and cell culture studies for toxicity test were performed.

As a result; an innovative topical formulation providing anti-aging efficacy, containing astaxanthin that had a strong antioxidant activity was developed.

VI. BÖLÜM

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Abd El-Mohdy, H.L. (2007). Water sorption behavior of CMC/ PAM hydrogels prepared by γ -irradiation and release of potassium nitrate as agrochemical; *Rea. Func. Pol*, 67:1094-1102.
2. Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T., Değim, Z., Doğanay, T., Takka, S., Tırmaksız, F. (2007). Modern Farmasötik Teknoloji: Deriden Emilim ve Deriye Uygulanan Yarı Katı Preparatlar, Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Ankara, s. 337-361.
3. Ackerman, C., Flynn, G.L., Smith, W.M. (1987). Ether/water partitioning and permeability through nude mouse skin in vitro II. Hydrocortisone 21-n-alkyl esters, alkanols and hydrophilic compounds, *Int. J. Pharm.*, 36: 67-71.
4. Anand, B., Pisal, S.S., Paradkar, A.R., Mahadik, K.R. (2001). Applications of organogels in pharmaceuticals. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 60 311-318.
5. Andrews, G.P., Gorman, S.P., Jones, D.S. (2005). Rheological characterisation of primary and binary interactive bioadhesive gels composed of cellulose derivatives designed as ophthalmic viscosurgical devices, *Biomaterials*;26:571–580.
6. Andrews, G.P., Jones, D.S. (2006). Rheological characterization of bioadhesive binary polymeric systems designed as platforms for drug delivery implants, *Biomacromolecules*;7:899–906.
7. Arı, F., Dere, E. (2003). Benzen'in karaciğer glutatyon s-transferaz enzim aktivitesine in vitro etkisi, *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 24(1).
8. Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*. 4(20): 483–95.
9. Barros, M.P., Pinto, E., Colepicolo, P., Pedersén, M. (2001). Astaxanthin and peridinin inhibit oxidative damage in Fe²⁺-loaded liposomes: Scavenging oxyradicals or changing membrane permeability? *Biochem Biophys Res Comm*.288,225-32.
10. Barry, B.W. (1983). *Dermatological Formulations: Properties that influence percutaneous absorption*, Marcel Dekker Inc., New York, s. 127-234.
11. Barry, B.W. (1991). Lipid-protein partitioning theory of skin penetration enhancers, *J. Control. Release*, 15: 237-248.
12. Bochot A., Fattal, E., Gulik, A., et al. (1998). Liposomes Dispersed Within a thermosensitive Gel: A New Dosege Form for Ocular Delivery of Oligonucleotides, *Pharam. Res*.
13. Bonacucina, G., Cespi, M., Misici-Falzi, M., Palmieri, G.F. (2006). Rheological, adhesive and release characterization of semisolid Carbopol/ tetraglycol systems. *Int J Pharm*;307:129–140.

14. Boussiba, S. (1999). Carotenogenesis in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular Physiology and Stress Response, *Physiologia Plantarum* 108: 111-117.2000.
15. Bouwstra, J. A. (1997). The skin barrier, a well organized membrane, *Colloid Surface A*, 1997, 123, 403-413.
16. Brain, K. R., Walters, K. A., Watkinson, A. C. (2002) *Dermatological and Transdermal Formulations, Methods for Studying Percutaneous Absorption*, Marcel Dekker, New York, 197-269.
17. British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationery Office. London, (1988).
18. Brown, K.M., Arthur, J.R. (2001). Selenium, selenoproteins and human health: a review, *Public Health Nutrition*, 4(2B):593-599.
19. Cevc, G. (1996). Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: Permeation enhancement, vesicle penetration and transdermal drug delivery, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, 13: 257-320.
20. Chao, Y., Zhengyu, J., Xueming, X., Haining, Z., Wangyang, S. (2008). Preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Food Chemistry* 109 (2008) 264–268.
21. Charalambopoulou, G. C., Steriotis, T. A., Hauss, T., Stubos, A. K., Kanellopoulos, N. K. (2004). Structural alterations of fully hydrated human stratum corneum, *Physica B*, 2004, 350, 603-606.
22. Chen, X., Chen, R., Guo, Z., Li, C., Li, P. (2007). The preparation and stability of the inclusion complex of astaxanthin with β -cyclodextrin. *Food Chem.* 2007, 101, 1580–1584.
23. Cheng, D.C.H. (1987). Thixotropy, *Int J Cosm Sci* 9 : 151-91.
24. Chien, Y.W., Cabana, B.E., Mares, S.E. (1982). *Novel Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker Inc., New York, s. 193.
25. Chiu, A., Kimball, A.B. (2003). Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. 2003; 149: 681-9.
26. Cho, C., Shin, S., Oh, I. (1997). Thermorheologic properties of aqueous solutions and gels of poloxamer 407, *Drug Dev Ind Pharm* ;23:1227–1232.
27. Cindrić, M., Galić, N., Vuletić, M., et al. (2006). Evaluation of recombinant human interferon α -2b structure and stability by in-gel tryptic digestion, H/D exchange and mass spectrometry, *J Pharm Biomed Ana*, 40:781-787.
28. Crane, F.L. (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10, *Journal of the American College of Nutrition*, 20(6):591–598.
29. Çakatay, U., Kayalı, R. (2006). Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Journal Medicine*. 2006; 37:62–7.
30. Dada, L.A., Chandel, N.S., Ridge, K.M., Pedemonte, C., Bertorello, A.M. et al. (2003). Hypoxia-induced endocytosis of Na, K-ATPase in aveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta *J Clin Invest*. 2003; 111:1057–64.
31. DaPeng, P., SiShun, H., Yan, H., et al. (2007). Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian

- influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays; *Vet Immun. Immunopath*, 117:17-25.
32. Değim, I.T. (1996). Physico-chemical determinants of skin penetration, Ph. D. Thesis, Welsh School of Pharmacy, University of Wales College of Cardiff, Cardiff, U. K.
 33. Delia Rodriguez-Amaya, B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods, Ilsi Press, Washington.
 34. Delozier, M. R., Orlich, S. (2005). Discovering influential cases in linear regression with minitab peeking into multidimensions with a Minitab macro, *J R Stat Soc B*, 2005, 2, 71– 81.
 35. Demirel, A., Bozdağ, G., Kart, C., Gürgan, T. (2006) Yaşlanma Fizyolojisi ve olası teoriler. *Turkish Journal of Geriatrics*. 9(4):250–5.
 36. Denizot, F., Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J ImmunolMethods*. 89: 271–277.
 37. Desai, D. D., Schmucker, J. F., Light, D. (2006). Carbopol Ultrez 10 Polymer: A new universal thickener for the personal care industry, Noveon.
 38. Diridollou, S., Vabre, V., Berson, M., Vaillant, L., Lagarde, J.M., Gregorie, J.M., Gall, Y., Patat, F. (2001). Skin Ageing: Changes of Physical Properties of Human Skin In vivo, *Int. J Cosm Sci* 23:353-362.
 39. Dristi, K., Frank, T. R., Hudson, N., et al. (2007). Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinised waxy maize starch with pectin gels, *F. Hydro*,21:1296-1301.
 40. Du, G., Li, M., Ma, F., Liang, D. (2009). Antioxidant capacity and the relationship with polyphenol and Vitamin C in Actinidia fruits, *Food Chemistry*, 113:557–562.35.
 41. Dumortier, G., Grossiord, J.L., Agnely, F., and Chaumeil, J.C. (2006). A Review of Poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics, *Pharm. Res*.
 42. Dumortier, G., Grossiord, J.L., Zuber, M., et al. (1991). Rheological study of a thermoreversible morphine gel, *Drug Dev Ind Pharm*;17:1255–1265.
 43. Eric, W., Smith, John, M., Haigh. (1989). In Vitro Systems for Assessment of Drug Release from Topical Formulations and Transmembrane Permeation, School of PharmaceUlical Sciences, Rhodes University, Grahamstown, South Africa.
 44. Foldvari, M. (2000). Non invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. *Pharm Sci Tech Today*. 2000, 12, 417-425.
 45. Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xia, E.Q., Li, H.B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits, *Food Chemistry*, 129:345- 350.
 46. Gallardo, V., Munoz, M., Ruiz, M.A. (2005). Formulations of hydrogels and lipogels with vitamin E. *J Cosm dermatol*. 4: 187-92.

47. Gershon, D. (1999). The mitochondrial theory of aging: Is the culprit a faulty disposal system rather than indigenous mitochondrial alterations? *Exp Gerontol.*34:613-619,1999.
48. Ghosh, T.K., Pfister, W.R., Yum, S.I. (1997). Transdermal and topical drug delivery systems, Interpharm Press Inc., Buffalo Grove.
49. Gladwell, N., Rahalkar, R.R., Richmond, P. (1986). Influence of Disperse Phase Concentration Upon The Viscoelastic Behaviour of Emulsions. *Rheol. Acta* (1986). 25: 55-61.
50. Godin, B., Touitou, E. (2007). Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models, *ADV Drug Deliver Rev*, 2007, 59, 1152– 1161.
51. Gök, V., Kayacier, A., Telli, R. (2006). Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı antioksidanlar. *Gıda teknolojileri dergisi* (2): 35-40,2006.
52. Gulcin, D., Kirecci, E., Akkemik, E., Topal, F., Hisar, O. (2010). Antioxidant, antibacterial, and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae), *Turk J Biol*, 34:175-188.
53. Halliwell, B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view, *Nutrition Reviews*, 52(8).
54. Hama, S., Takahashi, K., Inai, Y., et al. (2012) Protective effects of topical application of a poorly soluble antioxidant astaxanthin liposomal formulation on ultraviolet-induced skin damage. *J Pharm Sci.* 2012 Aug;101(8):2909-16.
55. Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance, *Int. J. Mol. Sci.*, 8:950-988.
56. Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J.Gerontol.* 1956; 11:298-300.
57. Hiroyuki, K., Sunao, N., Yuka, M., Yoshiharu, T., Kenji, K. (2005). Hydration and dehydration behavior of N-isopropylacrylamide gel particles, *Colloid Polym Sci*, 283: 1163-1171.
58. Horakova, K., Sovcikova, A., Seemannova, Z., et al. (2001). Detection of drug-induced, superoxide-mediated cell damage and its prevention by antioxidants. *FreeRadicBiolMed.* 2001; 30: 650–664.
59. Huang, S., Fu, X. (2010). Naturally derived material-based cell and drug delivery systems in skin regeneration, *J. Control. Release* 142:149-159.
60. Hussein, G., Goto, H., Oda, S., Sankawa, U., Matsumoto, K., Watanabe, H. (2006). Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and histopathological effects in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.* 29 (4): 684–688.
61. I. Higuera-Ciapara, L., Felix-Valenzuela, F.M., Goycoolea, W., Arguelles-Monal. (2004) .Microencapsulation of astaxanthin in a chitosan matrix. *Carbohydrate Polymers* 56 (2004) 41–45.
62. Idson, B. (1978). Rheology: fundamental concepts. *Cosm Toilet* 93: 23-30.
63. Ikeda, S., Nishinari, K. (2001). ‘Weak gel’-type rheological properties of aqueous dispersions of non-aggregated kappa-carragenan helices, *J Agr Food Chem*;49:4436–4441.

64. Islam, M. T., Rodriguez-Hornedo, N., Ciotti, S., Ackerman, C. (2004). Rheological characterization of topical carbomer gels neutralized to different pH, *Pharm. Res*, 21:1192-1199.
65. Ismail, A., Marjan, Z.M., Foong, C.W. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables, *Food Chemistry*, 87:581–586.
66. Itagaki, H., Tokai, M., Kondo, T. (1997). Physical gelation process for cellulose whose hydroxyl groups are regioselectively substituted by fluorescent groups, *Pol*, 38:4201-4205.
67. Jakubovic, H.R., Ackerman, A.B. (1992). Structure and function of the skin: development, morphology, and physiology. In: *Dermatology*, Moschella, S.L., Hurley, H.J. (Eds.), WB Saunders Company, Philadelphia, 1992, s.3-87.
68. Jones, D. S., Woolfson, A. D., Djokic, J. (1996). Texture profile analysis of bioadhesive polymeric semisolids: mechanical characterization and investigation of interactions between formulation components, *J. Appl. Polym. Sci.*, 61: 2229-2234.
69. Jungersted, J. M., Hellgren, L. I., Jemec, G. B. E., Agner, T. (2008). Lipids and skin barrier function a clinical perspective, *Contact Dermatitis*. 58, 255– 262.
70. Kazanç, M.B. (1997). Antioksidan Vitaminler. *Sendrom*, Temmuz; 14-22.
71. Kean, T., Thanou M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan, *Adv. Drug Deliver Rev*, 62: 3-11.
72. Keaney, J.F., Larson, M.G., Vasan, R.S., Wilson, P.W.F., Lipinska, I. et al. (2003). Obesity and Systemic Oxidative stress clinical correlates of oxidative stress in the Framingham study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:434–9.
73. Kempainen, B. W., Reifenrath, W. G. (1990). *Methods for Skin Absorption*, CRC Press, 1990, USA, 1-23.
74. Keong, L. C., Halim, A. S. (2009). In vitro models in biocompatibility assessment for biomedical grade chitosan derivatives in wound management, *Int. J. Mol. Sci*, 10:1300-1313.
75. Khoo, H.E., Prasad, K.N., Kong, K.W., Jiang, Y., Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers: Color pigments in fruits and vegetables, *Molecules*, 16:1710-1738.
76. Kidd, P.M. (1997). Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage, *Alt Med Rev*, 2(3):155-176.
77. Kidoaki, S., Matsuda, T. (2008). Microelastic gradient gelatinous gels to induce cellular mechanotaxis *J. Biotech*. 133:225-30.
78. Kintzios, S., Yiakoumetis, I., Moschopoulou, G. et al. (2007). Differential effect of the shape of calcium alginate matrices on the physiology of immobilized neuroblastoma N2a and Vero cells: A comparative study, *Biosens Bioelec*, 23:543-548.
79. Koksall, E., Bursal, E., Dikici, E., Tozoglu, F., Gulcin, I. (2011). Antioxidant activity of *Melissa officinalis* leaves, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(2):217-222.

80. Krishnaiah, Y.S., Al-Saidan, S.M. (2008). Limonene enhances the in vitro and in vivo permeation of trimetazidine across a membrane-controlled transdermal therapeutic system, *Curr Drug Deliv*, 5: 70-76.
81. Kumar, R., Katare, O.P. (2005). Lecithin organogels as a potential Phospholipid structured system for topical drug delivery: A Review. *AAP S Pharmaceutical Sciences and Technology*. 6 (2). Article 40. 298-310.
82. Lai, P.M., Roberts, M.S. (1999). An analysis of solute structure-human epidermal transport relationships in epidermal iontophoresis using the ionic mobility: pore model, *J. Control. Release*, 58: 323-333.
83. Lampe, M.A., Williams, M.L., Elias, P.M. (1983). Human epidermal lipids: Characterization and modulations during differentiation, *J. Lipid Res.*, 24: 131-140.
84. Lan, Z. X., Tan, Z.C., Shi, Q., Yang, C. G. (2007). A novel gelling method for stabilization of phase change material Na₂HPO₄•12H₂O with sodium alginate grafted sodium acrylate, *Therm Acta*, 463:18-20.
85. Lang, R.A., Grüntzig, P. M. (2007). Weisgerber C., et al. Polyvinyl alcohol gel prevents abdominal adhesion formation in a rabbit model, *Fertil Steril*, 88:1180-1186.
86. Langer, R. (2004). Transdermal drug delivery: past, progress, current status and future prospects, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2004, 56, 557-558.
87. Lazarus, M.C., Baumann, L.S. (2001). The use of cosmeceutical moisturizers. *Derm Ther*;14:200-7.
88. Lee, A.J., King, J.R., Barrett, D.A. (1997). Percutaneous absorption: a multiple pathway model, *J. Control. Release*, 45: 141-151.
89. Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, *Food Chemistry*, 102:771–776.
90. Lim, P. F. C., Liu, X. Y., Kang, L., Ho, P. C. L., Chan, S. Y. (2008). Physicochemical effects of terpenes on organogel for transdermal drug delivery, *Int J Pharm*, 358: 102– 107.
91. Lin, T.J. (1962). Rheology fundamentals and applications in cosmetic industry. In: DeNavarre MG, ed. *Chemistry and Manufacture of Cosmetics*. New York: D Van Nostrand Company Inc, 315-38.
92. Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S., Liu, J. (2011). The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides, *Food Chemistry*, 126:261–269.
93. Llano, E. G., Mata, F. S., Bustamante, I. T. et al. (2007). Improvement deoxyribo nucleic acid spots classification in polyacrilamide gel images using photometric normalization algorithms, *Anal Chim Acta*, 595:145-151.
94. Long, Z., Fang, L., Maolin, Z., et al. (2007). Study on CMchitosan/Activated carbon hybrid gel films formed with EB irradiation, *Rad. Phy Chem*, 32:125-28.
95. Lorenz, T., (1999). A technical review of Haematococcus algae, *Naturose Technical Bulletin*, 060: 9 pages.

96. Lupo, M.P. (2001). Antioxidants and vitamins in cosmetics. *Clin Dermatol.* 19:467-73.
97. Martin, G., Mark, E., Huntley, M., Olaizola. (2003). Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* Vol.21 No.5 May 2003 Mera Pharmaceuticals Inc., 73–4460 Queen Kaahumanu Hwy, Suite 110, Kailua-Kona, Hawaii 96740, USA.
98. Martin, K.R., J.C. Barret (2002). Reaktif oksijen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum.Exp.Toxicol.*21: 71-75.
99. Masojidek, J., Torzillo, G., Kopecky, J., Koblizek, M., Nidiaci, L., Komenda, J., Lukavska, A., Sacchi, A., (2000). Changes in chlorophyll fluorescence quenching and pigment composition in the green alga *Chlorococcum* sp. grown under nitrogen deficiency and salinity stress, *Journal Applied Phycology*, 12: 417–426.
100. Matsushita, Y., Suzuki, R., Nara, E., Fokoyama, A., Miyashite, K. (2000). Antioxidant activity of polar carotenoids including astaxanthin- β -glucoside from marine bacterium on PC liposomes. *Fisheries Sci.*66,980-985,2000.
101. McCord, J.M. (1986). Superoxide dismutase: rationale for use in reperfusion injury and inflammation, *J. Free Radic. Biol. Med.*, 2:307–310.
102. Memişoğulları, R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 3:30-39.
103. Menon, G. K. (2002). New insights into skin structure: struching the surface. *Adv Drug Deliver Rev.* 54, 3-17.
104. Menon, G.K. (2002). New insight into skin structure: Stratching the surface, *Adv. Drug Del. Rev.* 54(1): S3-S17.
105. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth.* 65: 55-63.
106. Murdan, S. (2005). Organogels in drug delivery. *Expert Opinion in Drug Delivery.* 2(3),489-505.
107. Mutlu, B., Özer, Ö. (2006). The Improtance of Cosmetic Products in Skin Aging., *Türkiye klinikleri J Int Med Sci*, 2(17):35-39.
108. Nae, H.N. (1993). Introduction to rheology. In: Laba D, ed. *Rheological Properties of Cosmetics and Toiletries.* New York: Marcel Dekker Inc, 9-33.
109. Nishioka, T., Haga, H., Miyai, Y., et al. (2007). Three-Dimensional Tumor Cell Movement in Collagen Gel: Mesenchymal-to Amoeboid Transition in a Sub-Clone That Survived 10 Gy Irradiation; *Int J Rad Oncy Bioy Phys*, 69:148.
110. Nugent, M. J.D., Higginbotham, C. L. (2007). Preparation of a novel freeze thawed poly(vinyl alcohol) composite hydrogel for drug delivery applications; *Eur J Pharm Biopharm*, 67:377-386.
111. Olaizola, M., Huntley, M.E. (2002). Recent Advances in commercial production of Astaxanthin from microalgae. In: Fingerman M, Nagabhusanam R, eds. *Biomaterials and Bioprocessing.* Enfield, NH: Science Publishers.
112. Osborne, D.W., Amann, A.H. (1990). Topical drug delivery formulations, *The Upjohn Company*, Kalamazoo, Michigan.

113. Osterlie, M., Bjerkeng, B., Liaaen-Jensen, S. (1999). Accumulation of astaxanthin all-E, 9Z and 13Z geometrical isomers and 3 and 3' RS optical isomers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is selective. *J. Nutr.* 129, 2, 391-8.
114. Ozcan I., Aksu, B., Abaci, O., et al. (2007). Comparative statistical analysis of ex vivo permeation and antifungal activity studies of Terbinafine hydrochloride chitosan gels; *Eur J Pharm Sci*, 32:31.
115. Önder, M. (1998). Deri yaşlanmasına Etki Eden Faktörler. *T. Klin J Cosmetol* 1: 17-20.
116. Özsoy, Y., Güngör, S., Cevher, E. (2004). Vehicle effects on in vitro release of tiaprofenic acid from different topical formulations, *Il Farmaco*. 59, 563– 566.
117. Partidos, C. D., Beignon, A. S., Brown, F., Kramer, E., Briand, J. P., Muller, S. (2003). Applying peptide antigens onto bare skin: induction of humoral and cellular immune responses and potential for vaccination, *J. Control Release*. 85, 27-34.
118. Pena, L.E. (1990). Topical drug delivery: Gel dosage forms: Theory, formulation, and processing, Marcel Dekker Inc., New York, s. 381-388.
119. Penzes, T., Blazso, G., Aigner, Z., Falkay, G., Eros, I. (2005). Topical Absorption of Piroxicam from Organogels in Vitro and In Vivo Correlations. *International Journal of Pharmaceutics*, 298. 47-54.
120. Peppas, N. A. (1989). —Kinetics of mucus-polymer interactions. In: *Int. As. Pharm. Tech. (APV)*, May 22-24, Course No. 470.
121. Piau, J.M. (2007). Carbopol gels: Elastoviscoplastic and slippery glasses made of individual swollen sponges: Meso- and macroscopic properties, constitutive equations and scaling laws, *J Non-N Fluid Mec*, 144:1-29.
122. Pineapple. (2001). in *The Lawrence Review of Natural Products Monograph System. Facts and Comparisons*. St. Louis, MO, Wolters Kluwer.
123. Pore, J. (1996). Rheologie-Thixotropie. In: Pore J, ed. *Emulsions, Micro-emulsions, Emulsions Multiples*. Paris: Tec&Doc Lavoisier, 175-240.
124. Potts, R.O., Buras, E.M., Chrisman, D.A. (1984). Changes with age in the moisture content of human skin, *J. Invest. Dermatol.*, 82: 97-100.
125. Prasad, K.N., Cole, W.C., Kumar, B., Prasad, Che K. (2002). Pros and cons antioxidant use during radiation therapy. *Cancer Treat Rev*. 28:79–91.
126. Pratico, D. (2002). Lipid Peroxidation and the Aging Process. *Science of Aging Knowledge Environment*. 2002; 50: 5. <http://sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/sageke;2002/50/re5>.
127. Pugh, W.J., Degim, T., Hadgraft, J. (2000). Epidermal permeability penetrant structure relationship: 4. QSAR of permeant diffusion across human stratum corneum in terms of molecular weight, H-bonding and electronic charge, *Int. J. Pharm.*, 197: 203-211.
128. Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., Schoubben, A., Bonina, F., Rossi, C., Ricci, M. (2008). Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation, *Int J Pharm*, 357: 295– 304.

129. Puolakkainen, P.A., Twardzik, D. R., Ranchalis, J. E., et al (1995). The enhancement in wound healing by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) depends on the topical delivery system; *J Surg Res*, 58:321-329.
130. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *FreeRadicBiolMed.*, 26 (9-10): 1231-7.
131. Reid, M.L., Jones, S.A., Brown, M.B. (1990). Transient drug supersaturation kinetics of beclomethasone dipropionate in rapidly drying films, *Int J Pharm*, 2008, in press.
132. Remington's Pharmaceutical Sciences. (1990). 18th Edition, Mack Publishing Company, Pennsylvania.
133. Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents, *Medicinal Research Reviews*, 23(4):519-534.
134. Roopa, B.S., Bhattacharya, S. (2008). Alginate gels: I. Characterization of textural attributes, *J Food Eng*, 85:123-131.
135. Ropke, C. D., Kaneko, T. M., Rodrigues, R. M., Silva, V. V., Barros, S., Sawada, T. C. H., Kato, M. J., Barros, S. B. M. (2002). Evaluation of percutaneous absorption of 4 nerolidylcatechol from four topical formulations, *Int J Pharm*, 249: 109-116.
136. Rowe, R., Sheskey, P., Owen, S. (2005). *Pharmaceutical Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th edn., Pharmaceutical, London UK and American Pharmaceutical Association, Washington, USA.
137. Shaikh, I.M., Jadhav, K.R., Gide, P.S., Kadam, V.J., Pisal, S.S. (2006). Topical delivery of aceclofenac from lecithin organogels: preformulation study. *Current Drug Delivery*, 3, 417-427.
138. Shawn, A. M., Mareninov, S., Prasad, P., et al. (2007). Collagen gel contraction by ARPE-19 cells is mediated by a FAK-Src dependent pathway, *Exp Eye Res*, 85:790-798.
139. Shireen, K.F., Pace, R.D., Mahboob, M., Khan, A.T. (2008). Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats, *Food and Chemical Toxicology*, 46:3290–3294.
140. Shomaker, T. S., Zhang, J., Ashburn, M. A. (2001). A pilot study assessing the impact of heat on the transdermal delivery of testosterone, *J Clin Pharmacol.* 41, 677-682.
141. Siamak, P., Mohammad, N., Sarbolouki, M.P. (2002). In-vitro release of diclofenac diethylammonium from lipid-based formulations. *International Journal of Pharmaceutics* 241 185-190.
142. Silva, C.L., Topgaard, D., Kocherbitov, V., Sousa, J.J.S., Pais, A.A.C.C., Sparr, E. (2007). Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes, *BBA-Gen Subjects*, 2007, 1768, 2647– 2659.
143. Singh, S., Santinath, Aswal V.K., Bohidar H.B. (2007). Structural studies of agar–gelatin complex coacervates by small angle neutron scattering, rheology and differential scanning calorimetry, *Intl J Biol Macro*, 41:301-307.

- 144.Şevket, G., Tufan, K., Eren, A., Tolga, G., Yaşar, D. (2006). E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 2006 Volume 23, Suppl. (1/1): 85-89 Hydrobiology.
- 145.Tachaprutinun, A., Udomsup, T., Luadthong, C., Wanichwecharungruang, S. (2009). Preventing the thermal degradation of astaxanthin through nanoencapsulation. Int. J. Pharm. 2009, 374, 119–124.
- 146.Takahashi, T., Imai, M., Suzuki, I. (2005). High potential molecular properties of chitosan and reaction conditions for removing p-quinone from the aqueous phase. Biochem. Eng. J, 25:7-13.
- 147.Tanner, T., Marks, R. (2008). Delivering drugs by the transdermal route: review and comment, Skin Res Technol, 2008, 14, 249– 260.
- 148.Tas, Ç., Özkan, Y., Savaser, A., Baykara, T. (2003). In vitro release studies of chlorpheniramine maleate from gels prepared by different cellulose derivatives, Il Farmaco, 58:605-611.
- 149.Terech, P., Weiss, R.G. (1997). Low Molecular Mass Gelators of Organic Liquids and the Properties of Their Gels. Chemistry Reviews. 97:3133-3159.
- 150.The United States Pharmacopeia. (1990). XXII Edition, Mack Printing Company Easton, Pennsylvania.
- 151.Tinkler, J. H., Böhm, F., Schalch, W., Truscott, T.G. (1994). Dietary carotenoids protect human cells from damage. J.,Photochem. Photobiol. B. 26,283-285,1994.
- 152.Torissen, O.J., Hardy, R.W., Shearer, K. (1989). Pigmentation of salmonids – carotenoid deposition and metabolism. CRC Cr Rev Aq Sci. 1,209-25.
- 153.Torrissen, O.J., Christiansen, R.. (1995). Requirements for carotenoids in fish diets.11,225-230.
- 154.Torzillo, G. T., Göksan, C., Faraloni, J., Kopecky, J. Masojidek. (2003). Interplay between photochemical activities and pigment composition in an outdoor culture of Haematococcus pluvialis during the shift from the green to red stage. J. Applied Phycol., 15: 127-136.
- 155.Üstünes, L. (2009). Rx-Media Pharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı, İzmir.
- 156.Validation of analytical procedures. (1996). Proceedings of International Conference on Harmonisation (ICH), Commission of the European Communities.
- 157.Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, Chem. Biol. Interact., 160(1):1-40.
- 158.Van de Ven TGM, Hunter R.J. (1977). The energy dissipation in sheared coagulated sols. Rhed Acta 16: 534-543.
- 159.Velasco, M.V., Tano, C.T., Machado-Santelli, G.M., et al. (2008) Effects of caffeine and siloxanetriol alginate caffeine, as anticellulite agents, on fatty tissue: Histological evaluation. J Cosmet Dermatol 7:23-29.
- 160.Venkat Ratnam, D., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Ravi Kumar, M.N.V. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, Journal of Controlled Release, 113:189–207).

161. Walters, K. A., Roberts, M. S. (2002). The structure and function of skin, K. A. Walters, ed., *Dermatological and Transdermal Formulations, Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 2002, 119, New York, Marcel Dekker, Inc., 1-39.
162. Wang, K.J., Zhang, Y.J., Yang, C.R. (2006). New phenolic constituents from *Balanophora polyandra* with radical scavenging activity. *Chem Biodivers* 3:1317–24.
163. Wei, Y.H., C.Y., Pang. (2005). The Role of Mitochondria in human aging process. *Biotech International*, 17: 8-13.
164. Wiechers, J.W. (1999). Comparing instrumental and sensory measurements of skin moisturization, *Cosmet.Toilet.*, 114 (2), 29-34.
165. Williams, A. C. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery, From Theory to Clinical Practice*, First Edition, Pharmaceutical Press, London, UK.
166. Willmann, H., Walde, P., Luisi, P.L., Gazzaniga, A., Stroppolo, F. (1992). Lecithin Organogel as Matrix for Transdermal Transport of Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 81 (9), 871-874.
167. www.eczfab.anadolu.edu.tr, (2013). Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı “Reoloji”.
168. Yamashita, E. (2002). Cosmetic benefit of dietary supplements including astaxanthin and tocotrienol on human skin. 2002, *FOOD Style* 21, 6:(6) 112-117.
169. Yan, R., Zhao, F., Li, J., et al. (2007). Direct electrochemistry of horseradish peroxidase in gelatin-hydrophobic ionic liquid gel films; *Elect Acta*; 52:7425-7431.
170. Yazan, Y. (2002). Reoloji ve kozmetolojideki yeri, *Türkiye Klinikleri Kozmetoloji Dergisi*, 3:115-128.
171. Zatz, J. L., Kushla, G. P. (1996). *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems: Gels*, Volume 2, Marcel Dekker, s. 399-421.
172. Zhang, X. Z., Chu, C. C. (2005). Fabrication and characterization of microgel-impregnated, thermosensitive pnipaaam hydrogels, *Polymer* 46: 9664– 9673.
173. Zuber, M. (1996). *Controles pharmacotechniques*. In: Seiller Mand Martini MC, eds. *Formes Pharmaceutiques Pour Application Locale*. Paris: Tec&Doc Lavoisier, 129-139.

TEZ ÇALIŞMASINDAN SUNULAN BİLDİRİLER

POSTER BİLDİRİSİ

H. B. Eren, E. Azizoğlu, M. Arıcı, Ö. Özer, Astaksantin HPLC Metoduyla Miktar Tayini ve Yöntem Validasyonu, 14. Ulusal Kromatografi Kongresi, İzmir, Türkiye, Mayıs 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Doğum yeri ve tarihi : İzmir, 18.12.1989

Medeni durumu : Bekar

e-posta adresi : bilgeren89@hotmail.com

Yabancı dil : İngilizce

Eğitim Durumu

İlkokul : Meşkure Şamlı İlköğretim Okulu

Lise : İzmir Fen Lisesi

Lisans : Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Yüksek Lisans : Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi