



**EGE ÜNİVERSİTESİ**

**DOKTORA TEZİ**

**DERMOKOZMETİK AMAÇLI BİYOMİMETİK  
PEPTİT İÇEREN LİPİT NANOPARTİKÜLLERİN  
ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**Oğuz ÖZTÜRK**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 14.09.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**

**EÜ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DERMOKOZMETİK AMAÇLI BİYOMİMETİK  
PEPTİT İÇEREN LİPİT NANOPARTİKÜLLERİN  
ÜRETİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU**

**Oğuz ÖZTÜRK**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 14.09.2018**

**Bornova-İZMİR**

**2018**

Oğuz ÖZTÜRK tarafından doktora tezi olarak sunulan "Dermokozmetik Amaçlı Biyomimetik Peptit İçeren Lipit Nanopartiküllerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu" başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 14.09.2018.tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Şeray Karber

Raportör Üye

: Prof. Dr. Hülya AYAR KAYI

Üye

: Doç. Dr. Bircan Öntaş

Üye

: Prof. Dr. SEĞİL ÖNAL

Üye

: Doç. Dr. Gülşah SAMLI

MOHAMED

İmza  
Şeray Karber  
Hülya Ayar Kayı  
Bircan Öntaş  
Seğil Önal  
Gülşah Samli

## EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

### ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Dermokozmetik Amaçlı Biyomimetik Peptit İçeren Lipit Nanopartiküllerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

14/09/2018



Oğuz ÖZTÜRK

**ÖZET****DERMOKOZMETİK AMAÇLI BİYOMİMETİK PEPTİT İÇEREN  
LİPİT NANOPARTİKÜLLERİN ÜRETİLMESİ VE  
KARAKTERİZASYONU**

ÖZTÜRK, Oğuz

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Eylül 2018, 126 sayfa

21. yüzyılın anahtar teknolojisi olan biyoteknoloji, tüketicinin daha etkili ve güvenli ürün arayışları talepleri doğrultusunda, kozmetik endüstrisini etkisi altına almıştır. Yaşlanma karşıtı cilt bakım ürünlerinde meydana gelen yıllık % 6 lık büyüme hacmi biyoteknolojik ürünlerin pazarda etkinliğini arttırmıştır. Bu anlamda tez çalışmasında deri yaşlanmasına karşı engelleyici ürünler ortaya çıkarma amacıyla MMP-12 enziminin inhibisyonuna yönelik inhibitör peptit (PEP3) dizayn edilmiştir. PEP3, 13 µM konsantrasyon da, MMP-12 enzimini % 88 oranında inhibe etmiştir. 10 ug/ml PEP3 konsantrasyon ile HS68 hücre hattı üzerinde yapılan Western blot deneyinde, kollajen I, IV, elastin ve fibronektin proteinlerin miktarlarında artış gözlenmiştir.

PEP3, katı lipit nanopartikül (KLN) ile kapsüllenmiş ve transdermal salınım çalışması yapılmıştır. Yüklenme etkinliği % 59,92 olarak bulunmuştur. PEP3 yüklü KLN, mannitol ile kurutulmuş stabilite çalışması yapılmıştır. Nanotoksikolojik açıdan güvenlik değerlendirilmesi yapılan PEP3'ün, KLN içeren formülasyonunun, 28 gün kullanımı sonrasında başlangıca göre %18 oranında kırışıklık azalışı meydana getirdiği bulunmuştur. Fonksiyonerliği ve güvenilirliği kanıtlanmış olan PEP3 aktif içerik olarak dermokozmetik sektörüne DervatylTM marka (dermal renovation peptide) ürün adı ile sunulmuştur.

**Anahtar sözcükler:** Nanobiyoteknoloji, peptit tasarımı, katı lipit nanopartikül, dermokozmetik, yaşlanma karşıtı ürün.

**ABSTRACT****PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LIPID  
NANOPARTICLES CONTAINING BIOMIMETIC PEPTIDE FOR  
DERMOCOSMETICS**

OZTURK, Oguz

PhD In Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

September 2018, 126 pages

Biotechnology, the key technology of the 21st century, has influenced the cosmetics industry in line with the demands of more efficient and safe products. Annual growth rate of 6 % in anti-aging skin care products increased the effectiveness of bionanotechnology products in the market. In the scope of this thesis study, for the purpose of producing products against skin aging, the inhibitor peptide (PEP3) was designed for MMP-12 enzyme inhibition. PEP3 with 13 µM concentration inhibited the enzyme MMP-12 by 88%. In Western blot experiment conducted with PEP3 with 10 µg/ml concentration on the HS68 cell line, an increase was observed in the amounts of collagen I, IV, elastin and fibronectin proteins.

PEP3 was encapsulated with solid lipid nanoparticles (SLN) and transdermal release study was performed. The loading efficiency was found as 59,92%. The PEP3 loaded SLN was dried with mannitol and the stability study was performed. The nanotechnology safety evaluation of the formulation of PEP3 containing SLN resulted in a wrinkle reduction of 18% compared to baseline after 28 days of use. PEP3 has been presented to the dermocosmetics market under the brand name **Dervatyl™** (dermal renovation peptide).

**Keywords:** Nanobiotechnology, peptide design, solid lipid nanoparticle, dermocosmetics, anti-aging product.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Şenay Şanlıer hocama, tez izleme komitesinde bulunan Prof. Dr. Seçil Önal, Prof. Dr. Hülya Ayar Kayalı ve Doç. Dr. Burcu Okutucu hocalarıma,

Akdeniz Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Emin Türkay Korgun, Prof. Dr. Necdet Demir, Prof. Dr. Ahmet Küçükçetin hocalarıma ve ekibine, Süleyman Demirel Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Nilgün Gürbüz hocama, Ege Üniversitesi araştırma görevlisi Dr. Güliz Ak'a, Akdeniz Üniversitesi doktora öğrencisi Orhan Koçak ve uzman Taner Erkaymaz abime,

2015/05 nolu Arge ve İnovasyon Projesi desteğinden dolayı KOSGEB Antalya Hizmet Merkezi Müdürlüğü'ne,

Yaşamım her anında maddi ve manevi destekleri için anne ve babama, yoğun çalışmalarım sırasında sabır gösterdiği ve bana katlandığı için eşim Şadımın, çocuklarım Cemre ve Mete'ye, ayrıca çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen herkese teşekkür ederim.

**İÇİNDEKİLER**Sayfa

ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xxvii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Derinin Yapısı .....	3
2.1.1 Epidermis .....	4
2.1.2 Dermis .....	4
2.2 Deri Yaşlanması .....	7
2.2.1 Ekstrasellüler matriks yapısı (ESM) .....	10
2.3 Matriks Metalloproteinazların Yapısı (MMPs) .....	11
2.3.1 İnsan makrofaj metalloelastaz (MMP-12) .....	12
2.4 MMP İnhibitör Tasarımı .....	14
2.4.1 MMP-12 inhibitör tasarımı .....	15



**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

2.5 MMP'ların Cilt Yaşlanmasındaki Rolü .....	17
2.5.1 Cilt yaşlanmasında MMP 12'nin rolü.....	18
2.6 Cilt Yaşlanması Önlenmesi ve Tedavisi .....	19
2.6.1 Topikal terapi .....	21
2.7 Kozmetik Peptitler .....	22
2.7.1 Enzim inhibitör peptitler .....	25
2.7.2 Yaşlanma karşıtı olarak kullanılan ticari peptitler .....	26
2.7.3 Oligopeptidlerin transdermal olarak uygulanması.....	27
2.8 Kozmotoloji Perspektifinden Nanoteknoloji .....	28
2.8.1 Kozmesötiklerde katı lipit nanopartikül kullanımı .....	30
2.8.2 Nanokozmesötik kullanılan başlıca ürünler .....	32
2.8.3 Nanopartiküllere maruz kalma.....	33
2.8.4 Nanopartiküllerin cilt emilimi.....	34
2.8.5 Kozmetikte nanomateryal kullanma riski .....	35
3. MATERYAL VE METOD .....	38
3.1 Peptit Sentezi.....	38
3.2 MMP-12 İnhibitör Tarama Testi (Kolorimetrik) .....	39

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

3.3 Hücre Kültürü Deneyleri .....	40
3.3.1 %10'luk FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması .....	40
3.3.2 Dondurma besiyerinin hazırlanması .....	41
3.3.3 Peptit dozlarının ayarlanması .....	41
3.4 Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi .....	41
3.4.1 Hücrelerin tripsinizasyonu .....	41
3.5 Hücre Proliferasyonu Testi .....	42
3.6 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin'nin Western Blot Analizi ile Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi .....	43
3.6.1 Hücre lizatların hazırlanması .....	43
3.6.2 Protein miktar tayini .....	44
3.6.3 Kollajen I, IV, elastin ve fibronektin'nin immunoblot analizi .....	44
3.7 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin'nin İmmunfloresan Yöntemi ile Hücre İçi Gösterilmesi.....	47
3.8 Katı Lipit Nanopartiküllerin Hazırlanması .....	48
3.8.1 Peptit yüklü-KLN hazırlanması .....	48
3.8.2 KLN partiküllerinin karakterizasyonu .....	51
3.9 Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi .....	51

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

3.10 KLN Liyofilizasyon Çalışmaları.....	53
3.10.1 Liyofilize edilmiş KLN'lerin stabilite çalışması.....	53
3.11 PEP3 yüklü KLN'nin Kozmetik Amaçlı Formülasyonu .....	53
3.12 <i>In Vitro</i> Transdermal Difüzyon Çalışması .....	55
3.13. <i>In Vitro</i> Toksikolojik Testler.....	56
3.13.1 <i>In Vitro</i> 3T3 NRU fototoksisite testi.....	56
3.13.2 Bakteriyel geri mutasyon ames testi .....	58
3.13.3 <i>In Vitro</i> Epiderm <sup>TM</sup> deri korozyon testi.....	59
3.14 <i>In Vivo</i> Etkinlik Testleri.....	60
3.14.1 Dermatolojik test (patch –yama testi) .....	60
3.14.2 Cilt elastikiyet (esneklik) testi.....	60
3.14.3 Cilt kırışıklık testi (anti wrinkle).....	61
4. SONUÇLAR .....	62
4.1 PEP1, PEP2 ve PEP3'ün HPLC Kromatogram Görüntüleri.....	62
4.2 İnhibitör Tarama Testi ile PEP1, PEP2 ve PEP3'ün İnhibitör Etkisinin Ölçülmesi. ....	63
4.2.1 6,5 µM düzeyindeki inhibitör konsantrasyonun belirlenebilmesi için doğru eğiminin hesaplanması.....	63

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

4.2.2 13 µM düzeyindeki inhibitör konsantrasyonun belirlenebilmesi için doğru eğiminin hesaplanması.....	65
4.3 Farklı Konsantrasyonlardaki PEP3'ün, HS68 Hücrelerine Olan Proliferatif Etkisinin Belirlenmesi. ....	66
4.4 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin'nin Immunofloresan Analizinin Değerlendirilmesi .....	67
4.5 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin Proteinlerinin Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Değerlendirilmesi.....	70
4.6 KLN Formülasyonun Değerlendirilmesi .....	74
4.7 Kriyoprotektanlar ile Liyofilizasyon İşleminin KLN Üzerine Etkisi .....	76
4.8 %10 luk Mannitol İle Liyofilize Edilen PEP3 Yüklü KLN'nin Stabilizasyonunun Değerlendirilmesi.....	77
4.9 PEP3 Yüklü KLN'lerin Enkapsülasyon Veriminin Ölçülmesi .....	78
4.10 <i>In Vitro</i> Transdermal Difüzyon Çalışmasının Değerlendirilmesi.....	79
4.11 <i>In Vitro</i> Toksikolojik Testlerin Değerlendirilmesi .....	80
4.11.1 Fototoksisite- <i>In Vitro</i> 3T3 NRU fototoksisite testi sonuçları.....	80
4.12 Bakteriyel Geri Mutasyon Ames Testi Değerlendirmesi.....	81
4.13 <i>In Vitro</i> Epiderm™ Deri Korozyon Testi Değerlendirmesi.....	82
4.14 <i>In Vivo</i> Etkinlik Testleri.....	83
4.14.1 Dermatolojik test (patch –yama testi) sonucu değerlendirilmesi .....	83

**İÇİNDEKİLER (devam)**Sayfa

4.14.2 Cilt elastikiyet (esneklik) testi değerlendirilmesi.....	83
4.14.3 Cilt kırışıklık testi (anti wrinkle) değerlendirilmesi.....	84
5. TARTIŞMA .....	86
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	101
ÖZGEÇMİŞ .....	124
EKLER.....	

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1 Derinin yapısı.....	4
2. 2 Kronolojik ve fotoyaşlanmanın hücresel ve moleküler mekanizmalar üzerine etkileri .....	8
2. 3 ESM'de genç ve yaşlı cilt arasındaki farklılıkların gösterilmesi .....	9
2. 4 ESM yapısı .....	11
2. 5 MMP domain genel yapısı.....	12
2.6 MMP-12'in üç boyutlu yapısı. ....	13
2.7 Katı lipit (KLN) yapısı .....	31
2.8 Nanopartiküllerin emilim yolları .....	35
2.9 Geçerliliği kabul edilmiş <i>in vitro</i> testler. ....	37
3.1 PEP3 yüklü KLN oluşumunun şematik gösterimi.....	50
3.2 MF sistemi ile KLN oluşumunun gösterilmesi.....	50
3.3 Franz difüzyon hücresi görünümü. ....	55
3.4 Strat –M Membran yapısı. ....	55
4.1 PEP1 HPLC kromatogram görüntüsü.....	62

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 PEP2 HPLC kromatogram görüntüsü .....	62
4.3 PEP3 HPLC kromatogram görüntüsü .....	62
4.4 Kontrolün zamana karşı doğru eğimi grafiği .....	63
4.5 PEP1'nin zamana karşı doğru eğimi grafiği .....	63
4.6 PEP2'nin zamana karşı doğru eğimi grafiği .....	64
4.7 PEP3'ün zaman karşı doğru eğimi grafiği .....	64
4. 8 PEP1, PEP2,PEP3 ve NNHGH'nin MMP-12 inhibisyonu üzerine etkisinin zamana karşı gösterilmesi. ....	64
4.9 Kontrol grubunun zamana karşı doğru eğimi grafiği.....	65
4.10 PEP2'nin zamana karşı doğru eğimi grafiği. ....	65
4.11 PEP3'ün zamana karşı doğru eğimi grafiği .....	65
4.12 PEP1, PEP2,PEP3 ve NNHGH'nin MMP-12 inhibisyonu üzerine etkisinin zamana karşı gösterilmesi .....	66
4.13 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün, 72. saat sonunda HS68 hücrelerine olan proliferatif etkisinin dağılımı. ....	66
4.14 Kollajen I proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskopik görüntüleri.....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.15 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, kollajen I proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	67
4.16 Kollajen IV proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskopik görüntüleri.....	68
4.17 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, kollajen IV proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması. ....	68
4.18 Elastin proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskopik görüntüleri.....	69
4.19 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, elastin proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması .....	69
4.20 Fibronektin proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskopik görüntüleri.....	70
4.21 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, fibronektin proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması .....	70
4.22 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün kollajen I protein bantlarının görüntüsü. ....	71
4.23 PEP3 konsantrasyonlarının kollajen I proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi.....	71



## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.24 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün kollajen IV protein bantlarının görüntüsü.....	72
4.25 PEP3 konsantrasyonlarının kollajen IV proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi.....	72
4.26 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün elastin proteini bantlarının görüntüsü	73
4.27 PEP3 konsantrasyonlarının elastin proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi.....	73
4.28 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün fibronektin proteini bantlarının görüntüsü.....	74
4.29 PEP3 konsantrasyonlarının fibronektin proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi.....	74
4.30 Boş KLN'ye ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği.....	75
4.31 PEP3 yüklü KLN'ye ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği.....	75
4.32 PEP3 yüklü KLN TEM mikroskobu görüntüsü.....	76
4.33 PEP3 yüklü KLN'ye ait farklı zaman ve koşullardaki partikül büyüklüğü dağılımı grafiği.....	78
4.34 LC-MS/MS ile PEP3 standart grafiğinin çizilmesi.....	79
4.35 PEP3yüklü KLN in vitro difüzyon çalışmasının grafik olarak gösterilmesi.	80

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.36 UVA ışığı varlığında ve yokluğunda doza bağlı olarak cevap ve EC <sub>50</sub> değerlerinin gösterilmesi .....	81
4.37 PEP3 yüklü KLN yapısının zamana bağlı olarak koroziv etkisinin gösterilmesi.....	82
4.38 F1 formülasyonun, kullanım öncesi ve sonrasında cilt elastikiyet testi dağılım grafiği.....	84
4.39 F1 formülasyonun, kullanım öncesi ve sonrasında cilt kırışıklık testi dağılım grafiği.....	84
4.40 F1 formülasyonun, kullanım öncesi ve sonrası ASW 300 cihazı ile alınan cilt görüntüleri.....	85

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Topikal olarak kullanılan peptitler.....	25
2.2 2010 ve 2017 yılları arasında kozmetik amaçlı KLN kullanılan formülasyonları.....	33
3.1 MMP12 inhibitör testi uygulama yöntemi.....	40
3.2 Ayrıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması.....	46
3.3 KLN formülasyonu hazırlama oranları.....	49
3.4 F1 formülasyonu % ağırlıkça miktarları.....	54
4.1 KLN formülasyonun ölçülen partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.....	75
4.2 Farklı konsantrasyonlardaki kriyoprotektanlar ile liyofilize KLN lerin redisperse edilmesi ile ölçülen partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.....	77
4.3 PEP3 yüklü KLN lerin zamana göre farklı sıcaklıklardaki redisperse edilmesi ile ölçülen partikül büyüklüğü ve PDI değerleri.....	77
4.4 Enkapsülasyon verimi hesabı.....	79
4.5 UVA ışık yokluğunda (-UVA) 3T3 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda ölçülen OD değerleri.....	80
4.6 UVA ışık varlığında (UVA+) 3T3 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda ölçülen OD değerleri.....	81

**ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)**ÇizelgeSayfa

4.7 PEP3-KLN 'nin S9'suz ortamdaki TA100 suşu ile verdiği revertant koloni sayıları.....82



**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Ec <sub>50</sub>	Kullanılan kimyasal en etkili olduğu dozun yarısı
TM	Ticari marka
<u>Kısaltmalar</u>	
ESM	Ekstrasellüler matriks
MMP	Matriks metalloproteinaz enzimi
KLN	Katı lipit nanopartikül
PEP	Peptit
MF	Mikrofluidik sistem
HS68	İnsan deri fibroblast hücre hattı
PIF	Fotoirritasyon faktörü
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

## 1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, bilişim teknolojileri ve nanoteknoloji ile birlikte, ekonomik ve sosyal yansımaları ile hayatımızda önemli bir olgu olarak yer almaktadır. Biyoteknoloji bir bilim alanı olmasının ötesinde, gerçek bir jenerik teknoloji kimliği ile sosyo-ekonomik yaşamın ortasında kendine yer edinmiştir (Rinaldi, 2018; Kiper, 2013).

Biyolojik unsurların mal, teknoloji, enerji ve hizmet olarak üretilmesi şeklinde tanımlanan “biyoteknoloji” kapsamında, dermokozmetik (hem farmasötik bir ürün gibi orta derece etki oluşturan hem de klasik bir kozmetik ürün gibi işlev gören) ürünlerinde üretilmesi de yer almaktadır. Günümüzde, artan ve yaşlanan nüfus, azalan doğal kaynaklar ve çevresel kaygılar gibi küresel ve toplumsal sorunlar, tüketicilerin tercihlerini de etkilemiştir. Yüksek teknoloji ve güvenlik standartlarında üretilen ve geliştirilen biyonanoteknolojik kozmetik ürünlere olan ilgi artmaktadır.

Teknolojinin çok hızlı bir şekilde geliştiği dünyamızda, eğilimler sadece bilişim sektörü açısından değil, üçüncü büyük reel sektör olması açısından, tüketici yönelimleri ve tercihleri kozmetik sektöründe önem kazanmaktadır. Kozmetik ürün kullanımının 2020 yıllarda orta yaş segmentinden, genç segment diye tabir edilen 20-34 yaşlara kayması düşünülmektedir. Genç neslin ileri teknoloji içeren, sosyo-psikolojik rahatlama neden olabilecek, yüksek güvenlik standartlarında üretilen ve geliştirilen ürünlere ilgisi artacaktır. Biyonanoteknolojik kozmetik ürünler, yüksek standartlarda ve teknolojilerde üretildiği için ilaç gibi düşünülerek daha fazla tercih edilebilir hale gelebilecektir (Cammarano, 2010).

Son yıllarda, tüketicinin talebi doğrultusunda, yüksek performans, duyuşal yarar ve güvenlik amaçlayan sofistike formülasyonların geliştirilmesi kozmetik sektörünü teşvik etmiştir. İleri teknoloji içeren aktif bileşiklerin (büyüme faktörleri, sitokinler, antikorlar ve peptitler) cilde penetrasyonu sırasında meydana gelen zorlukları ortadan kaldırmak için lipit bazlı nano taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi için büyük çaba sarfedilmektedir (Rinaldi, 2008).

Bu tez çalışmasında, zaman içerisinde kaçınılmaz bir süreç olarak karşımıza çıkan deri yaşlanmasının etkilerini minimize etmek için, cilt yapısında bulunan dermis tabakasında yer alan ekstrasellüler matriks içerisindeki kollajen I, kollajen IV, elastin ve fibronektin gibi moleküllerin MMP-12 (matriks metalloproteinaz 12, makrofaj elastaz) enzimi tarafından yıkılımını engelleyecek, enzim inhibitör peptitler tasarlanmıştır.

Kozmetik ve yaşlanma karşıtı uygulamalar alanında özellikle de farmasötik alanda olduğu gibi nanoteknoloji yavaş salınımlı uygulama ile aktif bileşenlerin cilde iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. MMP-12 enzimine özgü inhibitör peptit, cilde penetrasyonunun artırılması için, katlı lipit nano partikül (KLN) ile kaplanmıştır.

Avrupa Birliği (AB), yeni Kozmetik Ürünler Yönetmeliği 1223/2009 ve Kozmetik Ürünleri Direktifi (76/768/EEC)1976 SSCNFP-Scientific Commiteeon Cosmetics and Non Food Products) bilimsel komitesi'nin kararlarına göre deri irritasyonu, deri hassasiyeti, deri perkutan absorpsiyonu, fototoksisite ve mutajenite/genotoksisite testleri yapılarak nanotoksikolojik açıdan güvenlik değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu testlerden sonra aktif içeriğimiz serum şeklinde formülize edilerek, *in vivo* çalışmaları tamamlanmıştır. *In vitro* ve *in vivo* testler ile fonksiyonerliği ve güvenirligi kanıtlanmış aktif içerik (etken madde) olarak dermokozmetik sektörüne **Dervatyl™** marka (dermal renovation peptide) ürün adı ile sunulmuştur.

## 2. GENEL BİLGİLER

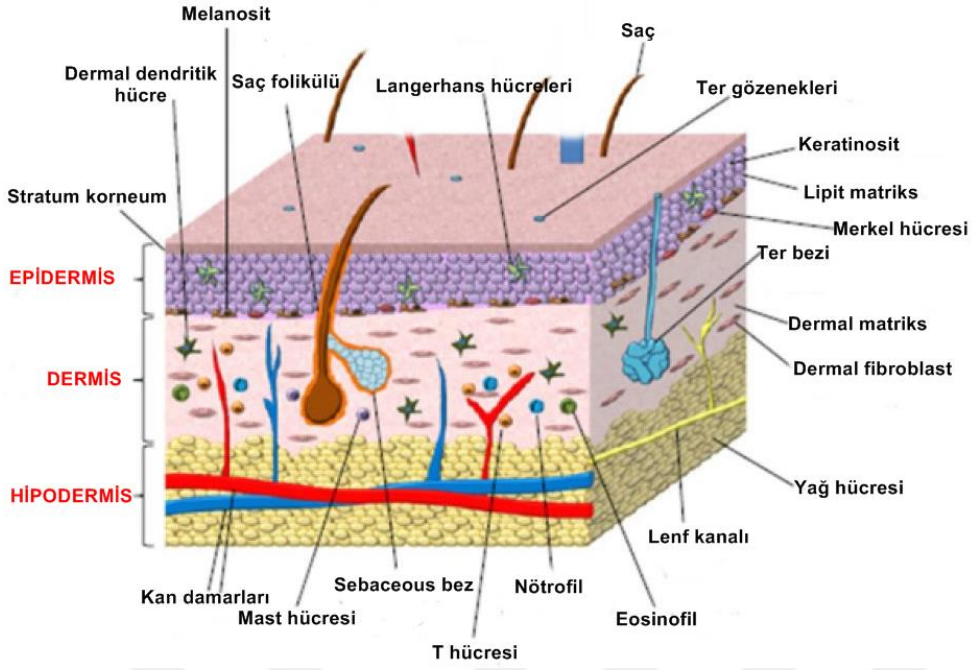
### 2.1 Derinin Yapısı

Cilt vücuttaki en büyük organdır ve vücut ağırlığının yaklaşık% 15'ini oluşturur. Kimyasal bileşim açısından cilt yaklaşık% 70 su,% 25 protein ve % 2 lipid içerir. Cilt, epidermis, dermis ve subkütan doku olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır.

Cildin her santimetre karesinde ;

- 6 milyon hücre
- 5.000 duyu son organı
- 400 cm sinir lifleri
- 200 ağrı sensörü
- 100 cm kan damarları
- 100 ter bezi
- 15 sebum salgı bezi
- 12 soğuk alıcı
- 5 kıl
- 2 ısı alıcısı bulunur (Fitzpatrick T.B et al., 2001).





Şekil 2. 1 Derinin yapısı (National Cancer Institute, 2018).

### 2.1.1 Epidermis

Epidermis sürekli olarak kendini yenileyebilen hücrelerden oluşan ve 5 tabakadan oluşan derinin en dış katmanıdır. Bu tabakalar dıştan içe doğru; Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum, Stratum basale (Jones and Watt, 1993).

Epidermis, yüzeyde düz nükleer hücreler tabakası (stratum corneum) ile yarı geçirgen bir bariyer gibi davranan dinamik bir yapıdadır. Epidermis, bazal katmandaki keratinositlerin hücre bölünmesiyle düzgün biçimde yenilenir. Bazal tabaka içindeki pigment hücreleri (melanositler) cildi ultraviyole ışınlarından korur (Baroni et al., 2012).

### 2.1.2 Dermis

Dermis epiderminin altındaki yapıdır. Dermisin bileşenleri fibröz doku ve interstisyel bileşenlerdeki hücreler tarafından oluşturulan dermal matristir. Ana bileşenler ağırlıklı olarak kollajen lifler (esas olarak I ve III tipleri), daha az miktarda elastik lifler, retiküler lifler ve matristen meydana gelir. Matristen genel olarak proteoglikanlar, jelatin, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, plazma

hücreleri, vasküler kanallar ve sinirlerden oluşmaktadır (Herskovitz et al., 2016).  
Dermiste bulunan proteinler;

### **2.1.2.1 Kollajen tip I**

Tip I kollajen, basit ve fibriler yapıda skleroproteindir. Kollajen başlıca fibroblastlar, miyofibroblastlar, osteoblast ve kondrositler tarafından sentezlenmektedir. Kollajen moleküllerinin en belirleyici özelliği, üç polipeptit zincirinden oluşan sarmal bir yapı oluşturmasıdır. Kollajenin yapısını oluşturan fibriller ve fiberler, deride paralel demetler halinde bulunur (Kramer et al., 2001).

Amino asit dizisinin tekrarlayan tripeptit şeklindedir. Bu tekrarlayan tripeptit, (Glisin–X–Prolin) veya (Glisin–X–Hidroksiprolin) şeklindedir. X, herhangi bir amino asit olabilir. Kollajenin yaklaşık %35'i glisin, %21'i prolin ve hidroksiprolin, %11'i alaninden oluşmaktadır (Sternlicht and Werb, 2001).

Yarı ömrü birkaç gündür ve kollajenazlar tarafından, glisin-lösin veya glisin-lösin aminoasitleri hedef alınarak degrade olur (Fields, 2013).

### **2.1.2.2 Kollajen tip IV**

Kollajen IV, deride epitelyal ve endotelyal hücreleri ayıran hücre dışı bazal membranlarda (BM) bulunan birincil kollajendir. Çoğunlukla lamina densada bulunur ve dermal-epidermal bileşkenin önemli bir bileşenidir. Diğer kollajen türlerinde olduğu gibi her üçüncü aminoasit kalıntısından sonra glisin içermez. Bu nedenle diğer kollajen alt tiplerine göre daha esnek bir yapıya sahiptir (Abreu-Velez and Howard, 2012).

Tip IV kollajen altı farklı alfa zincirinden meydana gelmiştir.  $\alpha 1-6$  (IV),  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ ,  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  ve  $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$  heterotrimerlerini oluşturur.  $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$  heterotrimerleri deri de bulunmaktadır (Hudson et al., 2003). MMP-2, MMP-9 ve MMP-12, kollajen IV'  $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$  zincirlerini degrade eder (Sandy et al,2013).

### **2.1.2.3 Elastin**

Bağ dokunun en önemli fibriler skleroproteini olarak, birçok yönlerden kollajene benzemektedir. Ribozomlarda proelastin olarak sentezlenir ve N-terminalinden tropoelastin ayrılır (Konugolu Venkata Sekar et al., 2017). Tropoelastin, elastin fibrillerinin polipeptit alt ünitesidir ve glisin ve alanin kalıntıları bakımından zengindir. elastaz yardımıyla yıkımı olur. Elastaz, özellikle elastin için proteolitik bir proteazdır; valin ve alanin gibi alifatik yan zincirli amino asitlerin karboksil ucundan molekülü parçalar (Van Doren, 2015).

Elastolizin yapı-fonksiyonu çalışmaları, MMP-12, MMP-2 ve MMP-9'a odaklanmıştır ve elastin için geniş bağlanma bölgelerini haritalandırmıştır. Makrofaj elastaz veya metalloelastase olarak da bilinen MMP-12, çözülmüş elastini, hem katalitik hem de hemopeksin bölgeleri ile etkileşerek degrade eder (Van Doren, 2015).

### **2.1.2.4 Fibronektin**

Glikoprotein yapısında bir proteindir. Kollajen salgılayan hücrelerde sentezlenir.

Ekstrasellüler matrikste kollajen ve proteoglikanlar, fibronektine bağlı olarak bulunur. Fibronektine bağlanma 'RGD' yapısı (arginin, glisin, aspartik asit) üzerinden olur. Fibronektin, ESM'nin karmaşık bir bileşenidir. Fibroblast büyümesini, yayılmasını, migrasyonunu artırır (Gildner et al., 2014).

Fibronektin, yara iyileşmesinde ve ekstrasellüler matriks (ESM) organizasyonunda ve ESM'nin stabilitesinde kritik bir rol oynamaktadır. *In vitro* çalışmalarda fibronektinin kollajen I'in ve diğer yapısal proteinlerin ESM içerisinde tutunmasında gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Sottile and Hocking, 2002). Fibronektinin, kollajen fibrillerin olgun kollajen liflerine kovalent çapraz bağlanmasından sorumlu lizil oksidazın (LOX) proteolitik aktivasyonunu düzenlediği de gösterilmiştir. Fibronektin yokluğunda, LOX'in katalitik aktivitesi dramatik olarak azaltılır ve daha az olgun kollajen matriksleri elde edilir.

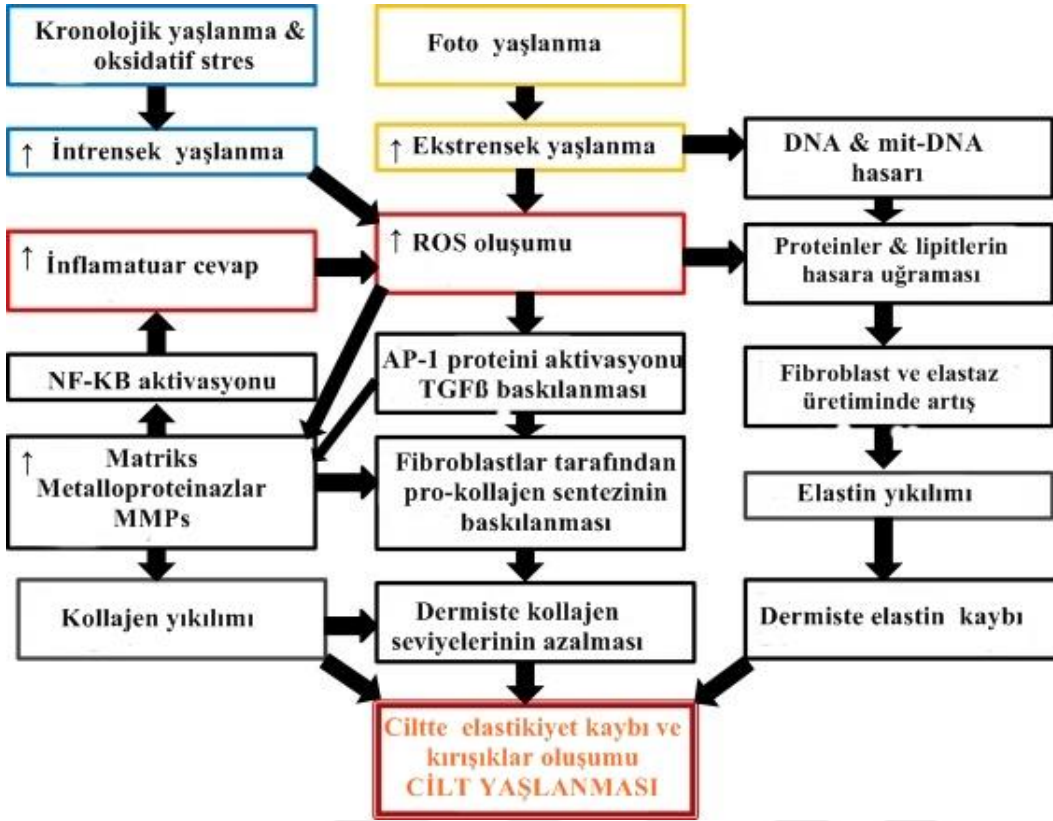
Fibronektinin fibroblast aracılığıyla kollajen kontraksiyonunda rol oynadığı *in vivo* olarak gösterilmiştir (Sethi et al., 2002).

## 2.2 Deri Yaşlanması

Deri yaşlanması patogenezi tam olarak anlaşılmayan derinin fonksiyonu ile görüntüsünü etkileyen progresif seyreden oldukça karmaşık dejeneratif bir süreçtir. Cilt yaşlanması, doğal bir insan "yaşlanma mozaiği"nin bir parçasıdır (Ganceviciene et al., 2012). Artan kırışıklık, sarkma ve gevşeklikle kendini gösterir. İntrensek (kronolojik, doğal yaşlanma) ve ekstrensek (dışsal yaşlanma) olmak üzere 2 farklı şekilde gerçekleşir (Kammeyer and Luiten, 2015). Ekstrensek yaşlanma genellikle güneş hasarına bağlı olduğu için fotoyaşlanma olarak da bilinir (Şekil 2.2).

Cilt yaşlanması ile birlikte; hücrel DNA onarım kapasitesinde azalma, telomerlerin kaybı, ektranükleer mitokondriyal DNA'nın nokta mutasyonları, oksidatif stres, artan kromozomal anormallikleri, tek gen mutasyonları, kronik inflamasyon, vb. gibi durumlar artmaktadır. İntrensek faktörün cilt yaşlanmasına katkısı %3 dür. Günümüzün sosyo ekonomik koşullarından kaynaklanan sigara, dengesiz beslenme, alkol ve diğer çevresel faktörler gibi ekstrensek yaşlanmayı oluşturan faktörlerin ise % 97 oranında katkısı vardır (Zhang and Duan, 2018).

ESM içerisinde bulunan matriks metalloproteinaz (MMP) enzimlerinin aktivitesi azalan MMP inhibitörlerine (TIPMP) baskın hale gelir (Millis et al, 1992). Yaşla beraber özellikle kollajen 1 ve 3 düzeyinde yılda %1 oranında kayıp olmakta ve kollajenler düzensiz bir şekilde organize olmaktadır (Ganceviciene et al., 2012).



**Şekil 2.** 2 Kronolojik ve fotoyaşlanmanın hüresel ve moleküler mekanizmalar üzerine etkileri. Pro-inflamatuvar Transkripsiyon Faktörü NF-kappB (NFkappaB), Aktivatör Protein-1 (AP-1)/ Transforming Growth Factor beta (TGFβ) 'dır (Lephart, 2016).

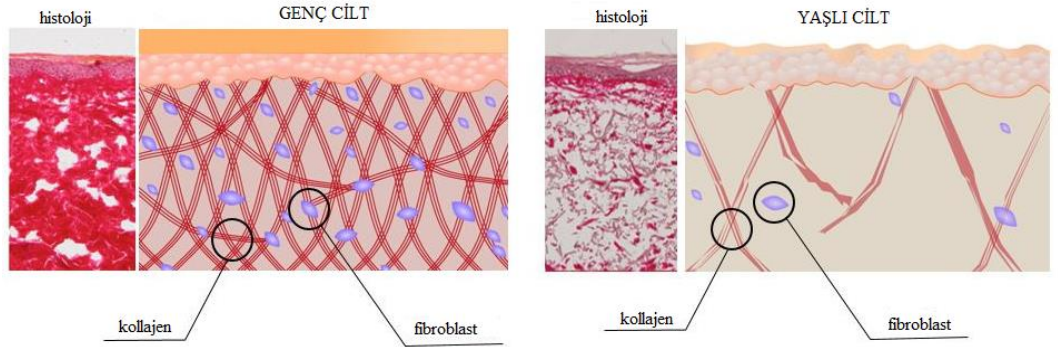
Ekstresek yaşlanma, ultraviyole etkisi ile görülen değişiklikleri içerir. Ultraviyole-A (UVA) dermal değişikliklere, ultraviyole-B (UVB) ise epidermal değişikliklere yol açarak foto yaşlanmada etkili olmaktadır.

Yaşlanmaya en fazla maruz kalan epidermistir. Çevre uyarılarını da yakalayan karmaşık bir sistem olan epidermis; keratinositler, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri gibi çeşitli hücre türlerinden oluşur (Boulais and Misery, 2008). Keratinositler, epidermal hücrelerin% 80-95'ini oluşturan en bol hücre çeşididir (Lorencini et al, 2014). Yaşla beraber epidermal hücrelerin yenilenme hızında ilerleyici bir azalma vardır. Genç yaştaki ciltte yaklaşık 28 gün süren epidermal büyüme, yaşlılarda 40-60 gün sürer. Yavaş döngü epidermiste inceltmeye neden olur ve yaşlanmış cildi ortaya çıkarır (McCullough and Kelly, 2006; Ramos-e-Silva et al., 2013).

Cilt yaşlandıkça, epidermal bağışıklık savunma sistemini uyaran ajanlar belirgin değişiklikler geçirirler: Langerhans hücresi sayısı, fonksiyonel yetenekleri düşer. IL-1'in (Interlökin 1) sekresyon seviyesi azaltılır, mitotik kapasiteyi ve epidermal lipit sentezini etkiler (Hachem et al., 2005;Tzaphlidou, 2004).

Kronolojik yaşlanma, dermisin kollajen üretme kapasitesini azaltarak, fibroblast metabolizmasını değiştirir. Yaşlanma sırasında, kollajen fibrillerinin genişlemesi cildin esnekliğini azaltır (Levakov et al., 2012). Dermal fibroblastlar, dinamik ve farklı bir hücre popülasyonudur. Kollajen liflerini üretirler. Dermal matrikste elastin ve fibronektin ile iletişim halindedirler (Bogdanowicz et al., 2016).

Bir doku yaşlandıkça, cadherin, katenin veya okludin gibi birleşme proteinlerinin seviyeleri azalır ve bu kayıp hücreler arasındaki boşlukların ortaya çıkmasına ve doku bütünlüğünü tehlikeye sokar (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3 ESM'de genç ve yaşlı cilt arasındaki farklılıkların gösterilmesi (Pure Skin Care, 2018).

Yaşlanmış fibroblastlar tipik olarak yüksek seviyelerde fibronektin, MMP' lar, büyüme faktörleri, interlökinler ve sitokinlerin yanı sıra yüksek düzeyde plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI) ve mitokondriyal ilişkili reaktif oksijen türleri (ROS) eksprese ederler. Bunun sonucu olarak meydana gelen kronik inflamasyon ve artmış MMP'lar, PAI ve ROS kombinasyonu ile elastin ağının bütünlüğünü bozar ve kollajen fiber ağını değiştirir. Yine de, bir paradoksik olarak, yaşlanan bir dokuda, kolajen lifleri sıklıkla uygunsuz bir şekilde glikozasyon yoluyla çapraz bağlanır. Bu anormal mekanik durum ESM organizasyonunu ciddi

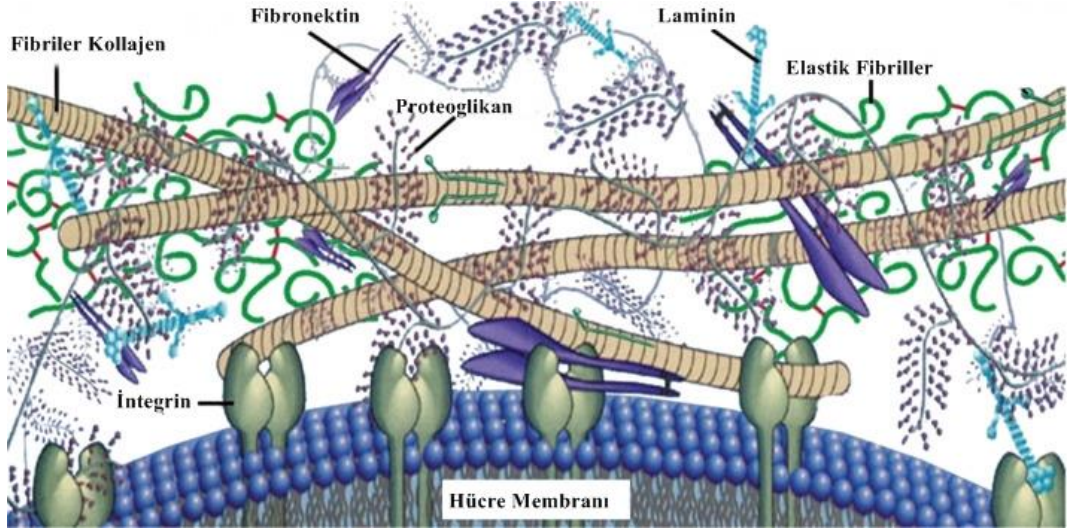
şekilde tehlikeye atabilir ve potansiyel olarak kanser gibi yaşa bağlı hastalıkları teşvik edebilir (Dunaway et al., 2018).

Epidermal keratinosit ve dermal keratinositlerden salgılanan matriks metalloproteinazları (MMP), ekstrensek ve intrensek yaşlanma da kollajenlerin, elastin ve fibronektin proteinlerinin yıkımından sorumludurlar. MMP seviyeleri, sitokin salınımı, UV ve oksidatif stres gibi çeşitli uyarılar sonucunda artar ve deride, kırışıklık, sarkma gibi çeşitli şekillerde kendini gösterir (Vincetti et al., 2002).

### **2.2.1 Ekstrasellüler matriks yapısı (ESM)**

Cildin hücre dışı elemanlarını oluşturan, hücrelerarası boşlukta doku bütünlüğü ve homeostazından sorumlu olan yapı Ekstrasellüler Matriks (ESM) olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.4). Ekstrasellüler componentleri, fibril oluşturan yapısal moleküller, fibril oluşturmeyen yapısal moleküller ve matrikelüler proteinleri oluşturur (Jarvelainen et al., 2009).

Fibril oluşturan moleküller, ESM'nin üç boyutlu yapısının oluşmasından sorumludurlar. Kollajen kuru deri ağırlığının % 77'sini oluşturan fibriller proteindir. Fibrin, fibronektin, vitronektin, elastin ve fibrillinde fibriller proteindir. Fibriller olmayan yapılar olan proteoglikanlar ve glikosaminoglikanlar (GAG'lar), deriye dinamik ve osmotik alan oluştururlar (Briquez et al., 2015). Fibriller proteinler, derinin sertliği ve elastikiyetinden sorumlu iken, interstisyel boşluğunun çoğunluğunu dolduran, proteoglikanlar ve GAG'lar, derinin hidrofilik doğasının, hidrasyon ve tamponlama kapasitesinin oluşmasından sorumludurlar. Derideki en bol proteoglikanlar arasında hiyalüronan (HA), dekorin, versikan ve dermatopontin bulunur (Carrino et al., 2000).



Şekil 2. 4 ESM yapısı (Aamodt and Grainger, 2016).

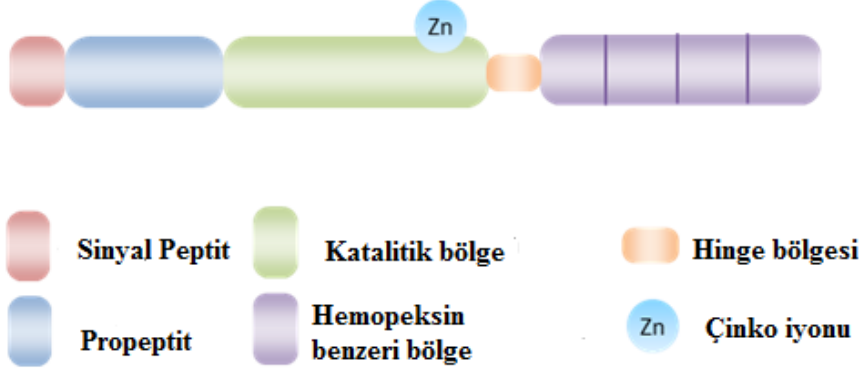
Matrikelüler proteinler, ESM'nin mekanik yapısına önemli ölçüde katkıda bulunmayan, fakat otokrin veya parakrin hücre-matris etkileşimine yardımcı olan moleküllerdir. Matrikelüler proteinler, osteopontin, asidik ve sistein bakımından zengin (SPARC) (osteonektin olarak bilinir), tenascin-C, fibulinler ve CCN dir (Tracy et al., 2016).

### 2.3 Matriks Metalloproteinazların Yapısı (MMPs)

MMP'ların hücre içinde bulunmasına ve hücre içi proteinlere karşı aktiviteye sahip olduğunun bilinmesine rağmen MMP'lar ESM proteinleridir. Tipik MMP, birkaç farklı alandan oluşur. Bu alanlar ön alan, propeptit, katalitik etki alanı ve hemopeksin alanlarından oluşur (Şekil 2.5). MT-MMP'larda (membran tipi) ön alan yoktur. Genellikle yaklaşık olarak 80 aa'dan oluşan propeptit alanı ayrıca yüksek oranda korunan sekans PRCGVPDV a.a'leri içerir. Katalitik bölge yaklaşık 170 aa'den oluşur ve çinko şelasyonu için gerekli olan korunmuş üç histidin sekansı içerir. Tipik bir MMP, değişken uzunluktaki bir eklem (hinge) bölgesi ve yaklaşık 200 a.a'lik hemopeksin alanı olarak bilinen bir bağlayıcı peptit içerir. Hemopeksin, diğer MMP'ler ve TIMP (metallopeptidaz inhibitör) ile etkileşimler için gereklidir. İstisnalar arasında MMP-7 (matrilisin-1), MMP-26 (matrilisin-2) ve MMP-23 bulunur. Bunlar eklem bölgesini ve hemopeksin bölgesini içermezler. MMP-23'ün benzersiz bir sistein bakımından zengin alan ve immüno globulin alanı vardır. Aktiviteleri için tipik MMP'ler, katalitik bölgedeki çinko iyonunu ve proteolitik



aktivasyonu gerektirir, çünkü bunlar inaktif zimojenler olarak sentezlenir (Yadav et al., 2014).



Şekil 2. 5 MMP domain genel yapısı (Agata et al., 2016).

### 2.3.1 İnsan makrofaj metalloelastaz (MMP-12) [EC 3.4.24.65]

İnsan makrofaj metalloelastaz (MMP-12), embriyonik gelişim, üreme, hücre göçü ve dokunun yeniden biçimlenmesi gibi süreçlerde ESM bileşenlerini bozan MMP lar, metisinkinlerin çinko proteinaz ailesinin bir alt sınıfının bir üyesidir.

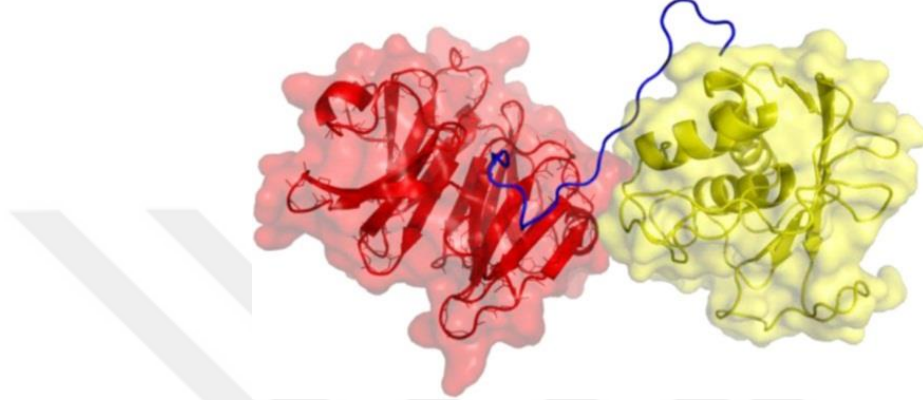
MMP-12, elastin, fibronektin, kollajen IV, laminin, entaktin, kondroitin sülfat ve heparan sülfat dahil olmak üzere geniş sayıda ESM bileşenlerine karşı aktiftir. MMP-12;  $\alpha$ 1- antitripsin, kollajen (tip I, V ve IV), jelatin, elastin, fibronektin, vitronektin, laminin, entaktin, osteonektin, decorin, aggrecan, biglikan, fibrillin, miyelin temel proteini, fibrin, fibrinojeni degrade eder (Wu et al., 2000).

Erişkin dokuda makrofajlar MMP-12'nin ana kaynağıdır. Çeşitli çalışmalar MMP-12'nin enflamatuvar süreçlerde rol oynadığını ve dokuların yeniden şekillenmesine ve doku yıkımına katkıda bulunduğunu göstermiştir. MMP-12 ayrıca elastolitik alanların yeniden şekillenmesine de katkıda bulunur.

#### 2.3.1.1 İnsan makrofaj metalloelastaz yapısı (MMP-12)

MMP-12, diğer MMP'ler ile ortak yapısal alanları vardır. En yakından ilişkili insan matriks metalloproteinazları, her biri MMP-12 ile % 49 özdeşliğe sahip stromelisin-1 (MMP-3) ve interstisyel kollajenazdır (MMP-1). MMP-12

proenzimin moleküler kütlesi 54 kDa'dır ve üç alandan oluşur. N-terminal proenzim alanı I (9 kDa + kısa sinyal peptidi), proenzim formlarındaki çinkoyu koordine eden yüksek ölçüde korunmuş bir sistein kalıntısı içerir (Şekil 2.6). Alan II, çinko bağlayıcı HExxHxxGxxH sekans motifini içeren katalitik alandır (22 kDa) 'dır. Bu alanı, vitronektin ve hemopeksine karşı sekans homolojisi gösteren "hemopeksin benzeri" C-terminal alanı III (23 kDa) takip eder (Nar et al.,2001; Maskos, 2005).



**Şekil 2.6** MMP-12'in üç boyutlu yapısı. Katalitik (CAT) etki alanı sarıdır, bağlayıcı /menteşe mavidir ve hemopeksin (HPX) alanı kırmızıdır. Yapı MMP-1'in X-ışını kristalografik analizlerine dayanmaktadır (Ndinguri et al., 2012).

54 kDa MMP-12 proenzim, diğer tüm matriks metalloproteinazlar gibi, N-terminal prosekansının kaybı ile aktif bir 45 kDa enzim bırakılarak aktive edilir. Bu aktif MMP-12, daha sonra C-terminal hemopeksin benzeri alanın kaybıyla olgun bir 22 kDa türüne kolayca işlenir.

MMP ailesinin birkaç üyesinin katalitik alanının yapıları yakın zamanda aydınlatılmıştır. Yapısal çalışmalarda, S1' alt-alanının MMP'ler de en iyi tanımlanmış bölge olduğunu ve büyük ölçüde değişen bir hidrofobik bölgeden oluştuğunu ortaya koymaktadır. Sığ S1' bölgelerine sahip MMP-1 ve MMP-7, P1' pozisyonunda küçük hidrofobik amino asitleri tercih eder. Tersine, derin S1' bölgelerine sahip olan MMP-3 ve MMP-8, benzer verimlilikte büyük ve küçük P1' amino asitleri barındırabilir (Shapiro, 1994).

Aktif bölge, S1'S1' adı verilen bir döngü bölgesi hariç, MMP'lar arasında korunmaktadır. MMP'ların aktif bölgelerindeki S1'S1' bölgesi hem sekans hem de

şekil olarak MMP'lar arasında biraz farklılık gösterir (Ramezani and Shamsara, 2018).

## 2.4 MMP İnhibitör Tasarımı

Hesaplamalı tasarım ve yönlendirilmiş evrim (Directed Evolution-DE) gibi protein mühendisliği (Protein Engineering-PE) metodolojilerinin geliştirilmiş ve /veya yeni kapasitelere sahip proteinlerin üretimi için son derece değerli olduğu kanıtlanmıştır. Bu metodolojiler, prekürsörün protein bazlı bir inhibitör olduğu hemen hemen her çalışma ile birleştirilebilir (Whitehead et al., 2001). PE, sadece geniş veya az fayda sağlayan proteinler üretmek için değil, aynı zamanda, ilgi konusu proteinin biyofiziksel ve biyokimyasal eğilimlerini ve biyolojik sistemdeki benzersiz rolünü incelemek için de bir araç olarak da kullanılabilir. Enzim-substrat spesifitesi, protein-protein etkileşimleri ve protein evrimine anlamlı bir bakış açısı sağlar. MMP'ların *in vitro* inhibisyonunun son derece zor olduğunu ve substrat bazlı peptidomimetik inhibitörler gibi doğrudan inhibisyon tekniklerinin, yüksek yapısal homoloji ve çapraz reaktivite nedeniyle MMP ailesi ile uyumlu olmadığı gözlenmiştir (Cathcart et al., 2015).

Proteazları ve daha spesifik olarak MMP'leri inhibe etmek için en yaygın strateji aktif bölgede ki çinkonun hedeflenmesidir. Geleneksel olarak inhibitörler, katalitik yarığın hedeflenmesi, çinko iyonunu bağlamak ve sonuç olarak enzimi inaktive etmek için substrat bazlı bir peptid omurgası ve çinko bağlama grubu (ZBG) ile tasarlanmıştır. Mekanik olarak, inhibitör enzimi bağladığında, ZBG'nin tipine göre çinko iyonunu bağlar. Bu amaçla, hidroksamat, karboksilat, aminokarboksilat, fosfinat ve sülfhidril grupları gibi birkaç ZBG kullanılmıştır. Aynı peptid omurgası üzerindeki ZBG repertuarındaki çeşitliliğin yanında geçiş durumu analoglarının ve ortak bir MMP tünel benzeri yapısal bir motif olan S1' boşluğu gibi MMP'lardaki ortak özellikleri hedefleyen yeni bileşiklerin substrat seçiciliği için önemli olduğu düşünülmektedir (Overall and Kleifeld, 2006).

Marshall (2015) ve arkadaşları son zamanlarda MMP-9 için, AB0041 ve AB0046 olmak üzere seçici ve güçlü allosterik inhibitör antikorlarının geliştirildiğini bildirmiştir. Her iki antikor da rekabetçi olmayan inhibisyon

özellikleri ile birlikte yüksek afinite ve etki gösterir. İlginç bir şekilde, bu antikorlar tercihli bağlanma sergiler. AB0041 sadece insan veya fare MMP-9'u ile bağlanırken AB0041 sadece fare MMP-9'u ile bağlanmıştır. Bu fenomen, araştırmacıların her bir antikorun bağlanma epitopunu haritalandırmasını sağlamıştır. İlk önce, bağlayıcı bölgeyi hemopeksin bölgesi olarak değil pro-cat bölgesi olarak belirlemişlerdir. Daha sonra nokta mutasyon analizi, bağlanma bölgesinin, aktif bölge çinkosu civarında olduğunu, ancak substrat bağlayıcı bölgelere müdahale etmediğini ortaya çıkarmıştır (Marshall et al., 2015).

Galvez ve arkadaşları (2001) MT1-MMP'nin düzenleyici ekzositlerini hedef alan bir dizi monoklonal antikor üretmiştir. Bu antikorlar yapısal homolojiyi aşarak MT1-MMP'ye özel katalitik alanın açık döngülerine karşı hedeflenmiştir ve sonuç olarak üretilen antikorların ailenin diğer üyeleri ile çapraz reaktivitesi sağlanmıştır. Antikorlarının MT1-MMP katalitik aktivitesini oldukça spesifik bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, anti-anjiyojenik özelliklere ve tümör hücresi invazyon özelliklerine karşı bir inhibitör etkisine sahiptirler.

#### **2.4.1 MMP-12 inhibitör tasarımı**

MMP inhibitörlerinin gelişimi, spesiflik eksikliği ve hedef dışı etkiler nedeniyle hüsrana uğramıştır. Daha yakın zamanlarda, inhibitör tasarımında, spesifiteyi geliştirmek için ikincil bağlanma bölgeleri (ekzositler) olarak kabul edilmiştir. MMP-13'ün katalitik (CAT) bölgesinde, CAT veya MT1-MMP'nin hemopeksin benzeri (HPX) bölgesinde ve MMP-2 ve MMP-9'un kollajen bağlama alanı (CBD) içinde ekzositleri bağlayan küçük moleküller ve peptitler geliştirilmiştir.

Antikor bazlı yaklaşımlar, MMP-9 ve MT1-MMP için CAT alan ekzositlerini hedefleyen seçici inhibitörlerle sonuçlanmıştır. Tasarım sürecine dışarıdan bağlanmayı içeren çeşitli geleneksel olmayan yaklaşımlar, MMP ailesi içinde arzu edilen seçicilikler ile inhibitörler sağlamıştır (Fields, 2015).

Kombinatoryal peptit kütüphanesi kullanarak Xu ve ark. (2007), MMP-2 kollajen bağlama alanının (CBD)  $\alpha 1$  (I) kollajen zincirinin kısa bir bölümünü

bağladığı belirlenmiştir. Daha spesifik olarak, Cys-Gly-Ala-Hip-Gly-Ala-Hip-Gly-Ser-Gln-Gly-Ala (Hyp = 4-hidroksiprolin olan P713 olarak adlandırılan), bir MMP-2 aktivitesi inhibitörü olarak tanımlanmıştır. P713, MMP-2 jelatin yarılmanın %90'ını (~ 30  $\mu$ M'un IC50 ) inhibe etmiştir ancak bağlanma için CBD gerektirmeyen bir peptid substratı üzerindeki MMP-2 aktivitesinin %20'sinden daha azını inhibe etmiştir. MMP-2'ye karşı spesifiteyi incelemek için, MMP-8 ile karşılaştırmalı inhibisyon analizleri yapılmıştır ve MMP-8 aktivitelerinde hiçbir değişiklik gözlenmemiştir.

Seçici inhibitör tasarımında kullanılabilen matriks metalloproteinaz (MMP) alt tipleri arasındaki ana yapısal farklılıklar vardır. MMP-12, MMP-8'e benzerdir ancak S1' bölgesi daha hidrofobiktir (Dorman et al., 2010).

Oldukça seçici MMP inhibitörlerini tanımlamak için fosfinik peptid kütüphaneleri hazırlanmıştır. Fosfinik peptitler iyi bir geçiş durumu mimikleridir ve farklı şekilde güçlü çinko metalloproteinaz inhibitörleri olarak davrandıkları gösterilmiştir. MMPlerin S1' boşluğuna giren, P1' pozisyonunda çeşitli sübstitüentleri barındıran fosfinik peptitlerin hazırlanmasını mümkün kılan bir kimyasal strateji kullanılmıştır. Bu strateji, P1' pozisyonunda ikame edilen izoksazol yan zincirleri gösteren fosfinik peptitlerin hazırlanması için tek bir adımda değiştirilebilir ortak bir prekürsör kullanımına dayanır. Bu tür fosfinik peptitlerde izoksazol halkası, derin bir boşluğa karşılık gelen MMP'ların S1' alt bölgesi ile etkileşime girebilen çeşitli kimyasal grupların doğru oryantasyonunu yansıtacak şekilde sert bir iskele olarak kullanılır. Bu stratejiye dayanarak, P1' konumunda dört farklı izoksazol yan zincirini ihtiva eden dört fosfinik peptid kütüphanesi inhibitörlerin P2' ve P3' pozisyonlarında ek kimyasal çeşitlilik eklenerek hazırlanmıştır (Devel et al., 2010).

Bu kütüphanelerin 10 farklı MMP'ye karşı taranması, MMP-12'nin yüksek orandaki seçici inhibitörlerin belirlenmesine olanak sağlamıştır. Özellikle, MMP-12'nin akciğer alveolar duvardaki elastinin yok edilmesinde ve amfizem patogenezinde önemli bir rolü olduğu öne sürülmüştür. Bu nedenle, ilgi çekici bir terapötik hedefdir (Devel et al., 2006).

## 2.5 MMP'ların Cilt Yaşlanmasıdaki Rolü

İnsan cildinin yaşlanması, zamanın geçişinden (içsel veya kronolojik yaşlanma) veya çevresel etkilerden (dışsal yaşlanma) kaynaklanabilir. Cildin içsel yaşlanması, yaşlanana kadar (>70 yaş) küçük histolojik değişiklik gösteren pürüzsüz ve ince kırışıklar halinde ortaya çıkarak birkaç klinik değişikliğe neden olur. Bu etki, kollajen ve elastik lifler azalmasıyla dermal ESM'nin genel atrofisini gözler önüne serer.

İntrinsik kutanöz yaşlanma, esas olarak elastik lifleri etkileyen yavaş, spontan, ilerleyici, kümülatif ve degredatif bir süreçtir. Dışsal yaşlanmada ise bu yavaş seyir, MMP'lar (ve diğer proteinazlar) tarafından yıllardan saatlere kadar enzimatik olarak hızlandırılabilir. Hem dışsal hem de içsel yaşlanmada kutanöz MMP'ların yüksek seviye ve etkinlikleri gösterilmiştir (Cole et al., 2018).

Dermal fibroblastlar, ciltte oluşan dermal matriks dönüşümünü de içerecek şekilde çalışan dinamik ve farklı bir hücre popülasyonudur. Bunlar, kutanöz yara onarımında ve biyo-mühendislikte önemli bir rol oynar. Ayrıca, dermal bağ dokusunun ekstraselüler matriskin (ESM) ana bileşeni olan kollajen lifleri üretebilirler. Bunun yanında, kollajen ağına bağlı fibroblastlar, epidermis için dermal destek sağlar ve dokularda elastik özellikler oluşturur. Hücre-ESM etkileşimleri, deri üzerindeki normal homeostasis, yaşlanma, yara iyileşmesi ve hastalıkları etkilerler (Tracy et al., 2016).

Elastik lifler, ömür boyu elastik işlevi korumak için tasarlanmıştır. Bununla birlikte, MMP'lar ve serin proteazlar gibi çeşitli enzimler, elastik lif moleküllerini bölebilirler. Elastik liflerde parçalanma ve katılaşma nedeniyle oluşan elastikiyet kaybı, bağ dokularının yaşlanmasında önemli bir faktördür. Cildin foto yaşlanmasının erken safhaları, elastik lif proteinlerinin diferansiyel bozunması ile karakterize edilirken, ESM proteazlarının etkinliği güneş ışınlarına maruz kalmış deride artmaktadır (Bogdanowicz et al., 2016).

MMP'lar cildin hem dışsal hem de içsel yaşlanmasında önemli katılımcılardır (Fisher et al.1996). İnsan cildinin düşük doz UVB ışınına maruz kalmasından sonra

ilk kez MMP ekspresyonunun *in vivo* artışı ve etkinliklerini göstermiştir. MMP ekspresyonunun uyarılması hem keratinositlerde hem de fibroblastlarda transkripsiyon faktörleri AP-1 ve NFκB'nin upregülasyonu yoluyla meydana gelmiştir (Lephart, 2016).

MMP-1, ciltteki iki büyük fibril olan, tip I ve III kollajenlerini oluşturan moleküllerden oluşan kollajen üçlü sarmalın yarılmasını başlatabilen tek enzimdir. MMP-3 ve -9, sadece MMP-1 tarafından başlatıldıktan sonra dermal fibriler kollajenleri (tip I, III ve V) yıkabilirler (Sardy, 2009).

Hem dışsal hem de içsel yaşlanmada, kutanöz MMP'lerin yüksek seviye ve etkinlikleri kanıtlanmıştır. 18-29 yaş grubu ile karşılaştırıldığında, güneşe karşı korunan ciltte 60 yaşın üstündeki hastalarda MMP-1, -2 ve -9'un önemli derecede yüksek olduğu bulunmuştur. Paralel olarak, yaşlı cildin hem normal deride hem de akut yara onarımı sırasında azalmış TIMP seviyeleri içerdiği bulunmuştur. (Ashcroft et al.,1997).

### 2.5.1 Cilt yaşlanmasında MMP 12'nin rolü

Makrofaj metalloelastaz (MMP-12); ekstraselüler olarak salgılanan ve makrofajlar, endotel hücreler, düz kas hücreleri, kornea epitel hücreleri, osteoklastlar ,kondrositler ve fibroblastlar gibi birkaç hücre tipinde eksprese edilen MMP'ların bir üyesidir (Narimiya et al., 2017). MMP-12; elastin, kollajen tip IV, fibronektin, laminin, jelatin ve vitronektin dahil olmak üzere birçok ESM proteinini degrade eder (Hiller et al., 2000; (Ramezani and Shamsara, 2018).

MMP-12'nin, tip IV ve tip V kollajenlerini degrade eder. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada insan derisindeki tip I ve tip III kollajende MMP-12 aracılı bölünme ürünleri tespit edilmiştir (Amar et al., 2017).

MMP-12'nin CAT bölgesi, 33° C'de tip I ve III kollajenlerini yıkar. Burada klasik bölünme alanında ve birçok başka dizide hidroliz oluşur. MMP-12'nin, özellikle UV ışınlarına maruz kalma gibi faktörlere yanıt olarak deride eksprese olduğu bilinmektedir. Elastin gibi ESM'nin diğer bileşenlerini degrade ederek bazı

hastalıkların oluşmasında rol oynamıştır. Ancak, MMP-12, özellikle tip I kollajene karşı kollajenaz olarak düşünülmediğinden birkaç çalışma haricinde MMP-12'nin kollajen yıkımı sırasındaki rolü kısmen araştırılmamıştır. Bu çalışmalarda bile, diğer kollajenazları uyararak MMP-12'nin kollajen tip I'i doğrudan veya dolaylı olarak bozup bozmadığı konusunda şüphe vardır. Örneğin, MMP-12'nin MMP-2 ve MMP-3'ün *in vivo* etkinliğini katalize ettiği bilinmektedir (Taddese et al., 2010).

Araştırmacılar MMP-12'nin kemokinleri ve diğer ekstraselüler proteinleri sindirerek elastolizini dolaylı olarak etkileyebileceğini öne sürmüşlerdir. Elastin fibrilleri üzerinde biriktirilen MMP-12, plazminojen yokluğunda elastini sindirmek için gerekli olan MMP'dir (Van Doren, 2015). Kemokinler ve çok sayıda non-matriks proteinler, MMP-12'nin fizyolojik substratları olarak tanımlanmıştır.

Fibronektin (FN); hücre yapışması, büyümesi, göçü ve farklılaşması gibi birçok hücre fonksiyondan sorumlu olan çeşitli fizyolojik ligandlara ve reseptörlere bağlanan bir glikoproteindir. FN, normal kartilajda ESM'nin küçük bir bileşenidir ve ESM döngüsünün bir parçası olarak bir dizi proteaz tarafından FN fragmentlerine (FN-fs) ayrılabilir. MMP-12'nin nötr pH'ta bozulmamış FN'yi yıktığı gösterilmiştir (Zhang et al., 2012).

## 2.6 Cilt Yaşlanması Önlenmesi ve Tedavisi

Cilt yaşlanması, insan “yaşlanma mozaikinin” doğal bir parçası olup zamanla belirgin hale gelir ve farklı organ, doku ve hücrelerdeki farklı yörüngeleri takip eder. İç organların yaşlanma belirtileri gözle görülemezken, cilt geçen zamanın ilk belirgin işaretlerini gösterir.

Cilt yaşlanması, endojen veya içsel faktör (genetik, hücre metabolizma, hormon ve metabolik süreçler) ve eksojen veya dışsal faktörlerin (kronik ışık maruziyeti, kirlilik, iyonize radyasyon, kimyasallar, toksinler) kombinasyonu ile oluşan karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu faktörler, her cilt tabakasındaki kümülatif yapısal ve fizyolojik değişiklikler ile ilerleyen değişimlere ve özellikle güneşe maruz kalan cilt bölgelerinde cilt görünümündeki değişikliklere neden olur. İnce ve atrofik, ince kırışıklıklara sahip ve kuru şekilde içsel olarak yaşlanmış cildin aksine,



güneş ışınları sebebiyle yaşlanmış cilt tipik olarak kalınlaşmış bir epidermis, benekli renk değişimi, derin kırışıklıklar, gevşeklik, donukluk ve pürüzler ile kendini gösterir (Hoenig, 2017).

İçsel yaşlanma kaçınılmazdır ve atrofi, fibroblast redüksiyonu ve ince kan damarları ile sonuçlanır. Kollajen sentezi yaşla birlikte azaldığı için kollajen bu durumdan özellikle etkilenir. Aynı şekilde elastin de yaşla birlikte azalır. Dış kaynaklı yaşlanma, öncelikle UV hasarının etkilerinden kaynaklanır. Diğer nedenler arasında sigara kullanımı, kirlilik ve kötü beslenme gibi çevresel faktörler bulunmaktadır. Bu tip hasarlar kollajen ve elastinin degradasyonunu artırır. Yaşlanan deri; ESM proteinlerinde azalma, artan kollajen yıkımı ve azalmış fibroblast ile kendini gösterir. Ayrıca, bağışıklık, yara onarımı ve lif sentezinde azalma de görülmektedir (Naylor et al., 2011).

Dışsal yaşlanma, MMP ları etkinleştirir ve serbest radikallerin üretimine yol açar. MMP'ların bu etkinliği ayrıca ESM bozunmasına yol açar. Ayrıca serbest radikaller; TIMP leri doku inhibitörlerini inhibe eder. Kozmesötiklerin amacı, yaşlanmanın bu etkilerinden bazılarını hafifletmektir (Mora et al., 2016 ; Shin et al., 2005).

Güneşe maruz kalarak yaşlanan cilt, elastosiz ile karakterize edilir. Güneş ışınları sebebiyle yaşlanan ciltteki kollajen içeriğinin seyrek dağılımı ve azalması; kolajen üretimi aynı olsa dahi çeşitli matriks metalloproteinazlar, serin ve diğer proteazlar sebebiyle artan kollajen yıkımına bağlı olabilir. Yaşlı ciltte kollajen düzensiz ve dağınık görünür.

Başarılı yaşlanma' paradigması, sağlıklı ve aktif yaşam şekline odaklanmakta, yaşlanmanın geleneksel olarak bir hastalık dönemi olarak kavramsallaştırılmasına karşı çıkmakta; cilt, yüz ve vücut üzerindeki yaş işaretlerini en aza indirmeye denk tutulmaktadır. Bu açıdan, önleyici estetik dermatoloji sağlıklı yaşlanma isteğini destekleyebilir ve özellikle cilt kanseri olmak üzere belirli cilt hastalıklarını tedavi edebilir veya önleyebilir. Lokal ve sistemik tedavi yöntemlerini, araç gereçlerini ve invaziv prosedürleri birleştirerek cilt yaşlanmasını geciktirebilir (Mora et al., 2016).

Cilt yaşlanmasını geciktirici bir tedavinin başlıca özelliği, sağlıklı, pürüzsüz, lekesiz, yarı saydam ve esnek bir cilde ulaşmaktır. Klinik uygulamalarda, “daha iyi görünmek”, “daha genç görünmek” anlamına gelmez. Bu nedenle hastaların tüm isteklerini anlamak ve tüm tedavi tekniklerini bilerek en tatmin edici sonuçları verecek tedavi yöntemine yönlendirmek çok önemlidir. Bireysel durum için strateji seçilmeden önce yaş, daha önce uygulanan işlem veya ameliyatlar, genel sağlık durumu, cildin türü, yaşam tarzı ve diğer birçok faktör göz önünde bulundurulmalıdır.

İstenen terapötik yaşlanma karşıtı tedavi; cildi canlandırma ve gençleştirme, her cilt tabakasının tek tek restorasyonu ve genel olarak bağışıklık, genetik, duygusal durum, sağlık durumu ve yaşam tarzı gibi diğer birçok faktörün ışığında çeşitli yöntemleri birleştiren, sürekli ve adım adım uygulanan bir işlemdir. Bu inceleme, invaziv prosedürlerin kullanımında en önemli topikal ve sistemik terapötik araçları ve eğilimlerini vurgulayacaktır (Ganceviciene et al., 2012).

Etkili kozmesötikler, etkilerini korurken bir yandan da stratum korneumun içine nüfuz edebilmelidir. Ayrıca, cildin bariyer fonksiyonunu etkilemeden de görünür faydaları olmalıdır. Yeni kozmesötiklerde son dönemde bir artış olmuştur, peptitlerin işlevleri, sınırları ve yararları, büyüme faktörleri, sitokinler ve bu ürünlerde kullanılan kök hücreler konusunda araştırmalar devam etmektedir (Malerich S et al., 2014).

### **2.6.1 Topikal terapi**

Topikal terapi, mikro ve makromoleküllerin deri içine girdiği yollar açısından;

- 1) Keratinositlerin hücreler arası boşluklarını işgal eden lipit matriks boyunca hücre içi yol,
- 2) Keratinositler boyunca transselüler yol,

3) Saç kökleri, yağ bezleri ve ter bezleri yoluyla transappendageal yol olmak üzere üç başlık altında sınıflandırılabilir:

Topikal ürünlerin kökeni ise dört farklı tipe sınıflandırılabilir (Desai et al., 2010).

1) Sentetik (peptidler, seramidler, çoğu vitaminler) ürünler.

2) Doğal kaynaklardan (botanik bitki özleri) çıkarılan / saflaştırılan ürünler.

3) Fermantasyon ve hücre kültürü (enzimler ve kofaktörler, polisakkaritler ve proteinler) gibi biyoteknoloji ile elde edilen ürünler.

4) Hayvansal kaynaklardan elde edilenler (Lintner et al., 2010).

## 2.7 Kozmetik Peptitler

Peptit, peptit bağları ile bağlanan bir grup aminoasittir. Kimyasal komplekslik açısından, peptitler tipik küçük molekülü kimyasallar ve daha büyük proteinler arasındaki bir pozisyonu doldurur. Doğal olarak oluşan peptitlerin, savunma, bağışıklık, stres, büyüme, homeostaz ve reproduksiyon dahil olmak üzere çok çeşitli fizyolojik süreçlerde sinyal / düzenleyici moleküller olarak çok çeşitli biyolojik rollere sahip oldukları bilinmektedir. Son zamanlarda, dermatoloji ve kozmetik sektörü için, ekstraselüler matriks sentezi, pigmentasyon, doğal immünite ve inflamasyonda rol alan kısa, kararlı ve sentetik peptitler geliştirmiştir (Pai et al. 2017).

Sonuç olarak, biyoaktif peptitler veya biyomimetik peptitler mevcut bilgiler ışığında ortaya çıkarılmıştır. Son birkaç yıl içinde dikkate değer derecede biyolojik etkinliğe sahip çeşitli peptitler sentezlenmiştir. Peptitler kozmetik, terapötik ve immünolojiden gıda bilimlerine kadar çeşitli alanlarda kullanılabilir. Peptitler, ilaç şirketlerinin satışlarının %10'unu oluşturmakta ve bu da yılda 25 milyar Dolara denk gelmektedir. Peptitler oldukça hızlı bir şekilde ticarileşmektedir. 2017 yılına kadar, küresel kozmetik pazarının 42,8 milyar doları

civarında kar ettiği tahmin edilmektedir (Global Kozmesötikler Pazar Görünümü, 2020)

Diğer yandan, biyomimetik peptitler, fizyolojik peptitlere özdeş bir amino asit sekansına sahip olan, fakat biyoteknolojik olarak sentezlenen bileşiklerdir. Reseptörler ile etkileşerek büyüme faktörleri ve sitokinlerin etkinliklerini taklit eder ve yaşlanmanın yavaşlaması gibi klinik etkiler sağlarlar (Gazitaeva et al., 2017).

Biyoaktif veya topikal peptitler aynı zamanda sentetik bileşiklerdir, fakat bunlar cilt geçirgenliğini, stabilitesini, çözünürlüğünü ve hücre reseptörleri ile etkileşimi arttırmak gibi halihazırda var olan fizyolojik işlevleri iyileştiren modifiye amino asit zincirlerinden oluşur. Bunlar ayrıca bazı doğal fizyolojik süreçler, belirli peptitler ve protein fragmentlerinde bulunan spesifik aminoasit sekansları ile etkileşime girerek özel olarak uyarılır ve modüle edilir. Böylece, teknolojik bağlamda biyoaktif peptitler, farklı cilt koşullarında klinik uygulamalara sahip kozmetik sektörleri için giderek ümit verici hale gelmektedir (Fields et al., 2009).

Biyomimetik veya biyoaktif olan bu sentetik bileşiklerin çoklu uygulamaları, disfonksiyonlardan kaynaklanan cildin klinik yönlerini topikal olarak uygulamak, önlemek veya azaltmak için tasarlanmış formülasyonlarda kullanıldığında yaşlanma, hiperpigmentasyon, vücut yağının artması ve kırışıklık gelişimi için tedavi seçeneklerini sunar. Bu peptitler ayrıca kollajen ve elastinin sentezini de stimüle edebilir, yara iyileşme hızını ve fibroblast proliferasyonunu artırır, büyüme faktörleri ve hatta germe ve sıkılaştırma araçları gibi davranabilir (Gazitaeva et al., 2017).

Doğal ve sentetik peptitler ile farklı sentetik peptitler geliştirilmiştir. Bakır glisin-histidin-lizin (Cu-GHK), 1973'te Loren Pickard tarafından geliştirilmiştir. 80'lerin sonunda ilk bakır peptit, cilt bakım ürünleri arasındaki yerini almıştır. O zamandan bu yana yapılan araştırmalar ve sektör; ekstraselüler matriks sentezi, pigmentasyon, doğuştan gelen bağışıklık ve iltihaplanmada rol alan birçok kısa, stabil ve sentetik peptit geliştirmiştir. Bu peptitler, kollajen uyarımı, yara iyileşmesi, "botox benzeri" kırışıklık azaltma ve ayrıca antioksidatif, antimikrobiyal ve beyazlatma etkileri için kullanılmaktadır (Rahnamaeian et al., 2015).

2000 yılından bu yana, kozmesötik ürünlerdeki peptitlerin kullanımı çarpıcı bir şekilde artmıştır ve bu farklı moleküller hakkında kapsamlı bilgilerin yanı sıra bunların kullanımlarının altında yatan fizyolojik ilkeleri edinme ihtiyacını ortaya koymaktadır. Bu moleküller için ticari potansiyel, özellikle kozmetik aktivitesi olan (örneğin, yaşlanma karşıtı, antioksidan, beyazlatıcı) peptit sekansları için oldukça yüksektir (Malerich et al., 2014).

Kozmetikte kullanılan birçok peptit vardır. Peptidlerin klinik çalışmalarla kanıtlanan etkinlikleri bilimsel dergilerde çok fazla yer almamaktadır. Bazı klinik çalışmalar çok az katılımcı sayısı ile veya sadece tek bir çalışma ile gerçekleştirilmiştir.

Topikal kozmesötik peptitler (Çizelge 2.1); sinyal peptitleri, taşıyıcı peptitler, nörotransmitter inhibitör peptitleri ve enzim inhibitör peptitleri olarak sınıflandırılabilir (Schagen, 2017).

**Çizelge 2.1** Topikal olarak kullanılan peptitler.

Peptit Tipleri	Peptit İsimleri
Matrikinler	Karnosin, bakır tripeptid, trifloroasetil-tripeptit-2, tripeptit-10 sitrülün, asetil tetrapeptit-5, asetil tetrapeptit-9, asetil tetrapeptit-11, tetrapeptid pkek, tetrapeptid-21, heksapeptit, heksapeptit-11, palmitoil pentapeptit-4, palmitoyl tripeptide-3/5, palmitoyl tetrapeptide-7, palmitoyl hexapeptide-12, palmitoyl oligopeptid,
Taşıyıcı	Bakır tripeptid, manganez tripeptid-1
Mimetik nörotransmitter inhibe edici	Asetil heksapeptid-3, Pentapeptid-18, Pentapeptid-3, Tripeptid-3
Enzim inhibitörü	Soya fasulyesi, İpek fibroin ve Siyah pirinç oligopeptitleri
Yapısal protein sindirimi	Keratin peptit

### 2.7.1 Enzim inhibitör peptitler

Enzim inhibitör peptitleri, doğrudan veya dolaylı olarak enzimleri inhibe eder. Soya oligopeptitleri, ipek fibroin peptidi ve pirinç peptitleri cilt hücreleri üzerinde etkilidir. Yukarıda bahsedilen peptidler, tTAT-süperoksit dismutaz gibi enzimleri inhibe eder, hiyalüronan sentaz 2'yi uyarır veya soya oligopeptidleri durumunda proteinazları inhibe eder (Zhu et al., 2016).

Pirinç kepeği proteininin özel olarak işlenmesinin ardından, düşük moleküler ağırlıklı peptitler (<3000 Da) elde edilmiştir. Siyah pirinç oligopeptitleri MMP aktivitesini inhibe etmiş ve insan keratinositlerinde hyaluronan sentaz 2 gen ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde uyarmıştır (Sim et al., 2007 ). Pirinç kepeği proteini güçlü bir tirozinaz inhibitör peptit kaynağıdır. (Ochiai et al., 2016). Pirinç kepeği biyoaktif bileşikleri ile tutulan niosomları içeren formülasyonlar, klinik yaşlanma karşıtı özelliklere sahiptir (Manosroi et al., 2012).

### 2.7.2 Yaşlanma karşıtı olarak kullanılan ticari peptitler

Çeşitli peptitler, kollajen homeostazını modüle ederek yaşlanma sürecini etkiler. Pentapeptid-3 (Lys-Thr-Thr-Lys-Ser, KTTKS), bir kozmetik ajan olarak geliştirilen ilk oligopeptitlerden biridir. Bu peptit doza ve zamana bağlı olarak tip I ve tip III kollajen ve fibronektin üretimini uyarmaktadır (Katayama et al., 1991).

Palmitoyl tripeptide-3/5 bir hücre dışı matriks proteini, trombospondin-1 etkilerini taklit eder (TSP-1). TSP-1 TGF aktivitesini artıran doğal olarak oluşan bir moleküldür. Palmitoyl tripeptide-3/5, hayvan modellerinde ve insanda dermal fibroblastlar hücre kültürü testlerinde, kollajen sentezini arttırdığı bulunmuştur. (Murphy and Poczatek, 2000).

Tripeptid-1 (glisil-1-histidil-1-lisin) ayrıca palmitik asit ile konjuge edilmiştir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar kollajen ve glikosaminoglikanların sentezini uyardığı kanıtlamıştır (Gorouhi and Maibach, 2009).

Enzimatik çalışmalar, tripeptid-2'nin MMP-1, 3 ve 9'u inhibe ettiğini ve foto yaşlanma ve kronolojik yaşlanmada görülen aşırı dermal matriks yıkımını en aza indirdiğini göstermiştir. Trifluorotripeptid-2 ayrıca, disfonksiyon yapan telomerlerin yanı sıra yaşlanmayı indükleyebilen progerin üretimini azaltır. Bu nedenle, bu peptit yaşlanma sürecine dahil olan biyolojik mekanizmaları düzenler (Loing et al., 2012).

Tripeptid-10 (izolösin ve lisin ile aspartik asit) cilt sıkılaştırıcı olarak kullanılır. % 0.01 lipozomal tripeptid-10 ve plasebo kremleri karşılaştıran kontrollü bir çalışma da, tripeptid-10, deri esnekliğinde % 54'lük bir artışa neden olmuştur (Puig et al., 2008).

Bakır tripeptid kompleksi (Bakır Gly-L-His-L-Lys) en iyi incelenen peptitler arasındadır. Kollajen sentezini uyarır ve MMP-2 salınımını düzenler (Pickart and Schagen, 2015).

Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, peptit elastin fragmanı içerir ve elastin moleküllerine karşı yüksek bir özgülük derecesine sahiptir. Elastin sentezinin bir negatif geri besleme mekanizması aracılığıyla otheregölasyonuna dahil edilir (Reddy et al., 2012).

Dekapeptid-12 (Tyr-Arg-Ser-Arg-Lys-Tyr-Ser-Ser-Trp-Tyr), temel fibroblast büyüme faktörünün sentetik bir fragmanını içerir. Tirozinaz enzimini güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur. 4 aylık kullanım ile dekapeptit-12 kremi ile pigmentasyonda % 50 oranında azalma görülmüştür (Hantash and Jimenez, 2009).

### 2.7.3 Oligopeptidlerin transdermal olarak uygulanması

Bir ilacın transdermal olarak uygulanması, stratum korneum ve daha sonra dermisten dolaşıma veya dolaşım için hedef bölgeye geçişini içerir. Peptitler, pasif transdermal uygulama için zorluklar oluşturur, fizyolojik pH'dan etkilenebilir ve proteolitik enzimler yoluyla yapıları bozulabilir.

Penetrasyon arttırıcılar, stratum korneum'un lipid yapısını değiştirerek bariyer özelliklerini azaltır ve pasif olarak ciltten geçmeyen ilaçların geçirgenliğini artırır. Çeşitli penetrasyon arttırıcılar arasında alkoller, azonlar, heksanoatlar, oleik asit, pirolidonlar, üre, şeker esterleri ve sürfaktanlar gibi doymamış yağ asitleri bulunur. Bu permeasyon arttırıcı sınıfının, stratum korneum'un lipid yapısını bozarak veya "akışkanlaştırarak" ve bir ilacın difüzyon katsayısını arttıran lipid çift katmanı içinde mikro-boşluklar oluşturarak deri geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir.

Peptitlerin kapsüllenmesinin, deriden peptit geçişini arttırdığı gözlenmiştir. Lipozomlar, transferomlar, niyozomlar ve etozomlar gibi farklı tipte parçacıklar geliştirilmiş ve araştırılmıştır. Parçacıklardaki sürfaktanlar, lipidlerin lokal olarak akışkanlaştırılmasına yardımcı olur ve bu da parçacıkların uzun bir etki için bir depo oluşturdukları stratum korneum'un üst katmanlarında kalmasına izin verir. Lipozomlar, doğal olarak oluşan epidermal lipidlerden oluşur. Bu nedenle, biyolojik olarak bozunabilir ve zayıf immünojenik oldukları ve toksik olmadıkları için olası yan etki oluşturmaları pek mümkün değildir. Transfersomlar, cildin yüzeyindeki gözeneklerden derin katmanlara doğru kendilerini sıkıştırarak gidebilmelerine



olanak sağladığı iddia edilen şekilde doğada daha elastik olarak bulunur (Marepally et al., 2013; Kalluri et al., 2011).

Bu bileşenlerin aktivitesi veya etkinliği, Klingman'ın üç altın kozmetik kuralı kombinasyonu kullanılarak analiz edilebilir:

1) Aktif bileşen, stratum korneum'a nüfuz edebilir mi ve bu etki mekanizmasına uygun bir zaman dilimi boyunca deride belirlenen hedefe yeterli konsantrasyonlar da verilebilir mi?

2) Aktif bileşen, hedef hücrede veya insan derisinde bulunan dokuda belirli bir biyokimyasal etki mekanizmasına sahip midir?

3) Etkililik iddialarını kanıtlayacak, plasebo kontrolü yapılmış, istatistiksel olarak anlamlı, klinik çalışmalar yayınlanmış mıdır? (Klingman et al., 1986).

## **2.8 Kozmotoloji Perspektifinden Nanoteknoloji**

Nano malzemeler, yüzlerce yıl önce kozmetiklerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Altın ve gümüş nano parçacıklar, kadınlar tarafından tırnak ojesi olarak kullanılmıştır. Ayrıca, altın nano parçacıkları içeren sıvı formülasyonlar Orta Çağlarda yaşlanma karşıtı bir yöntem olarak kullanılmıştır. Ancak son yıllarda, nano ölçekli materyaller kozmetiklerin geliştirilmesinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

Nanomalzemelerin potansiyel olarak dermatolojik kullanımı, ilk nanokapsül bazlı kozmetik ürününün 1995 yılında Fransız firması L'Oreal tarafından kozmetik ürünlerinin etkisini arttırmak amacıyla piyasaya sürüldüğü zaman araştırılmıştır (Kothamasu et al., 2012).

Nanomalzemeler, kozmetik formülasyonlar için giderek daha da fazla kullanılmaktadır. Bu malzemeleri içeren ürünler, dünya çapında ilaç ve kozmetik pazarına büyük katkı sağlamıştır. 2012 ve 2015 yıllarında nanomateryalleri içeren ürünlerin satış miktarı, sırasıyla yaklaşık 155. 8 milyon dolar ve 2. 6 milyar dolar

olmuştur. Bu rakamın 2022'de 55.3 milyar dolara ulaşması beklenmektedir (Shokri, 2017).

Nanoparçacıklar, 1 nm ve 100 nm arasındaki boyutlarda, toplam birim olarak davranan ve tepki veren küçük maddelerdir. Organik ve inorganik maddelere ayrılabilir veya şekilleri, boyutları, yüzeyleri ve fiziko kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılabilirler.

200-350 daltondan daha büyük moleküller için cilt yoluyla permeasyon yapılması oldukça zordur. Maksimum boyut 400 dalton olarak kabul edilir. Bu nedenle geçirgenliği en üst seviyeye çıkarmak ve stratum korneum engelini azaltmak için nano partiküler yapıların önemli olduğu bilinmektedir (Barry, 2001).

Kozmetik ve yaşlanma karşıtı uygulamalar alanında özellikle de farmasötik alanda olduğu gibi nanoteknoloji yavaş salımlı uygulama ile aktif bileşenlerin cilde iletiminde önemli bir rol oynamıştır. Nanoküre terimi kulağa fütüristik bir teknoloji gibi gelmektedir. Kozmetiklerin artık kişisel görünüş kusurlarını örtbas veya kamufle eden ürünler olarak gösterilmediği gerçeğinden de anlaşılacağı gibi nanoteknoloji bir devrim niteliğindedir. Bu ürünlerdeki en son trend, klinik olarak kanıtlanmış malzemeleri, patentli iletim sistemleri ve kozmetiklerin estetiği ile birleştirmektedir. Kozmesötik ürünler, sadece cildi temizleyen ve güzelleştiren kozmetik ürünler değil aynı zamanda cildi iyileştiren ilaç ile kozmetik arasında ki boşluğu dolduran ürünlerdir (Kaur ve Agrawal, 2007).

Yeni ve yenilikçi uygulama sistemleri, tüketicinin algılayabileceği faydaları ve optimize edilmiş duyuşal özellikleri nedeniyle kozmetik alanında yeni ürün geliştirmeyi doğru dönüşmektedir. Yeni ilaç iletim sistemlerinin uygulamaları birçok kozmetik ürününde bulunabilir. Nano malzemeler günümüzde neredeyse tüm büyük kozmetik sektörlerinde kullanılmaktadır.

İlaçların cilde iletilmesi, araştırmacılar için hala zorlu bir sorundur çünkü ilaçların maksimum geçirgenliği, epidermin üst tabakası (stratum korneum) tarafından engellenir.

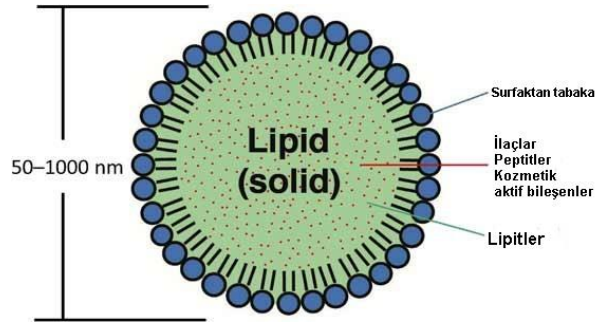
Kimyasal permeasyon arttırıcılar, sonoforez, iyontoforez, elektroporasyon, mikro iğneler gibi fiziksel yöntemlerin kullanımıyla gibi çeşitli yaklaşımlar ilaçların topikal olarak uygulanması için kullanılmıştır. Bu topikal ilaç uygulama yöntemleri bazı sınırlama ve dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, ultra-deforme olabilen lipozomlar, nanoyapılı lipit taşıyıcılar, nano emülsiyonlar, katı lipit nanoparçacıklar, lipoküreler, nanopartikül ve etozomlar gibi nano ilaç iletim sistemine dayanan yeni teknikler, epidermal ve dermal ilaç birikimini arttırmak için kullanılmıştır (Iqbal et al., 2018).

Nanomalzemeler ve nanobiyoteknoloji, kozmetik ve ilaçların faydalarını sağlama şeklini radikal bir şekilde değiştirme potansiyeline sahiptir. Ancak nanopartiküller, cilde faydalı çok çeşitli maddeleri kapsüllemek için özel olarak kullanılır. Bu şekilde, hem farmasötik hem de kozmetik kullanım için katı lipit nano partiküllerin (KLN) veya nano yapıları lipit taşıyıcıların (NLC) yanı sıra bir taşıma sistemi olarak karakterize edilen nano kesecikler geliştirilmektedir (Souto et al., 2008).

KLN'ler ve NLC'ler, esas olarak yüksek stabilitelere bağlı olarak cildin üzerinde film tabakası oluşturarak, suyun buharlaşmasını engeller ve cildin hidrasyonunu artırır. Bunun dışında, bu nano yapıları bileşikler, keratin tabakası ile daha fazla temas ederek, aktif bileşiklerin emilimini hızlandırır.

### **2.8.1 Kozmesötiklerde katı lipit nanopartikül kullanımı**

Katı lipit partikül (KLN'ler) boyutları 50 ila 1000 nm arasında değişen ve suda veya surfaktanın sulu solüsyonunda dağılmış fizyolojik lipitten oluşan submikron kolloidal taşıyıcılardır. KLN'ler çeşitli avantajlar nedeniyle kozmesötiklerde popülerdir: Düşük toksisite sergileyen fizyolojik ve biyolojik olarak çözünebilen lipitten oluşur; küçük boyutlardaki KLN'ler, stratum korneum ile yakın temas sağlar ve aktif bileşenlerin deriye nüfuzunu artırır (Garces et al., 2018).



Şekil 2.7 Katı lipit (KLN) yapısı (Garces et al., 2018).

KLN'ler, katı lipitler, emülgatörler ve sudan meydana gelmektedir. Lipit olarak trigliseridleri, kısmi gliseridleri, yağ asitlerini, steroidleri ve mumları içermektedir.

Ekim 2005'te kozmetik pazarına sunulan Nano Repair Q10 kremi ve Nano Repair Q10 Serumu (Dr. Kurt Richter Laboratorien GmbH, Berlin, Almanya) ürünleri, yaşlanma karşıtı tedavi alanında lipit nanoparçacıkların başarısını ortaya koymuştur (Muller et al., 2007). KLN'lerin fiziksel UV blokerlerinin özelliklerine sahip olduğu ve bu sayede daha az yan etkiye sahip etkili bir güneş koruyucu sistemi geliştirme seçeneği sunduğu bulunmuştur. Bir *in vivo* çalışmada, geleneksel bir kreme %4 oranında KLN eklenmesinin ardından 4 hafta sonra cilt neminin %31 oranında arttığı gösterilmiştir. KLN'ler ayrıca parfümler için topikal araç olarak kullanılması açısından da avantajlıdır. Parfüm/kokulara KLN eklenmesiyle, salınım yavaşlatılarak kokunun daha uzun süre kalıcılığı sağlanmaktadır (Lohani et al., 2014).

KLN, fizyolojik olarak iyi tolere edilen biyolojik olarak parçalanabilen hammaddeler olan lipit matriksi tarafından oluşturulur. Bu sistemlerin ana avantajları arasında, kararsız maddelerin kimyasal bozunmadan korunması, lipit matriksin katı hali ve deri üzerinde tıkaçıcı özellikler gösteren filmlerin oluşumu sebebiyle maddelerin salınımının kontrol edilmesi yer alır. Ayrıca hazırlanma sırasında organik çözücülerin önlenmesini sağlar ve büyük ölçekli üretim ve sterilizasyon işlemlerine uygunluk sağlar.

Bunların dışında KLN'lerin, partiküllerin küçük boyutu ve dolayısıyla yüksek yüzey alanı nedeniyle aktif maddelerin stratum korneum ile temasını

kolaylaştırmak konusundaki kapasitesi, taşınan maddelerin deriye yüksek oranlarda nüfuz etmesini sağlar (Raj et al., 2012).

Kolloidal büyüklükte olması, sulu dispersiyonları uzun süre stabil kalması,

otoklav veya gama ışınları ile sterilizasyon sağlanabilmesi, endüstriyel ölçekte üretimleri, etkin maddenin kontrollü salımı sağlanabilmesi, etkin maddenin çevresel etkenlerden korunması KLN sisteminin en önemli avantajlarındanındır.

## **2.8.2 Nanokozmesötik kullanılan başlıca ürünler**

### **2.8.2.1 Nemlendiriciler**

Stratum korneumun, temel amacı cildin koruyan birincil bariyeridir. Su stratum korneum'da hızla buharlaşır ve bu da dehidrasyona yol açar. Dehidrasyon sorunu cilde esneklik sağlayan nemlendiriciler kullanılarak önlenir. Lipozomlar, nanoemülsiyonlar, KLN'ler uzun süreli etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılan nemlendirici formülasyonlardır. Bunlar çeşitli cilt problemlerinin (örneğin atopik dermatit, sedef hastalığı ve pruritus) yönetimi için en yararlı ürünler olarak kabul edilir (Lohani et al., 2014, Xia et al,2017).

### **2.8.2.2 Güneş kremleri**

Güneş kremleri, cildi güneş ışınlarının zararlı etkilerinden korumak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çinko oksit (ZnO) ve titanyum dioksit (TiO<sub>2</sub>) cildi güneşten koruyan en etkili ve onaylı mineral bazlı bileşenlerdir. Bu mineral, cilt üzerinde materyalist bir bariyer oluşturur, UVA ve UVB ışınlarını cildin daha derin katmanlarına nüfuz etmemesi için yansıtır ve daha az tahriş edicidir. Geleneksel veya klasik güneş koruyucularının temel dezavantajı, uygulandığında cilt üzerinde beyaz bir tabaka bırakmasıdır. İşte bu noktada nanopartiküller devreye girmektedir. Geliştirilmiş güneş koruyucuları nanoteknolojinin yenilikçi kullanımından sadece bir tanesidir. ZnO veya TiO<sub>2</sub> nanopartiküllerin kullanan güneş koruyucu ürünler şeffaf, daha az yağlı ve daha az kokulu ve estetik çekiciliğe sahiptir (Grande and Tucci, 2016).

### **2.8.2.3 Yaşlanma karşıtı (anti aging) ürünler**

Kozmesötik sektörü, retinol, koenzim Q10, proteinler, peptitler ve biyoteknolojik olarak üretilen moleküller gibi daha pahalı aktif madde ve bileşenlerin kullanımını yapmaktadır. Yaşlanma karşıtı ürünler şu anda piyasada nanoteknoloji kullanılarak üretilen ana kozmesötiklerdir (Jose and Nette, 2018; Marto et al., 2017). NLC veya KLN ile, aktif bileşenlerin cilde iletilmesi için oldukça uygun araçlardır (Suter et al., 2016), (Garces et al., 2018).

Gainza (2014), rekombinant insan epidermal büyüme faktörü (rhEGF) ile yüklenen KLN ve NLC'yi geliştirmiş ve kronik yaraların iyileşme süresini azaltmak için bu sistemlerin kapasitesini değerlendirmiştir. Suter (2016), Nrf2'nin Keap1 bağlanma motifine karşılık gelen heptapeptit P7'yi içeren katı lipid nanoparçacıklarını araştırmıştır.

**Çizelge 2.2** 2010 ve 2017 yılları arasında kozmetik amaçlı KLN kullanılan formülasyonları.

<b>Formülasyon</b>	<b>Aktif madde</b>	<b>Kozmetik sınıfı</b>	<b>Kaynaklar</b>
Nano emulgel	Argan yağı, oktinoksat, vitamin E	Nemlendirici, güneş koruyucu	(Tichota et al., 2014)
Su içinde dağılım	Koenzim Q10, likopen, kuersetin, rekombinant epidermal büyüme faktörü (r EFG)	Anti aging,	(Lohan et al., 2015; Okonogi and Riangjanapatee, 2015; Bose et al., 2013; Gainza et al., 2014)
Hidrojel	Retinil palmitat	Anti aging	(Jeon et al., 2013)

### **2.8.3 Nanopartiküllere maruz kalma**

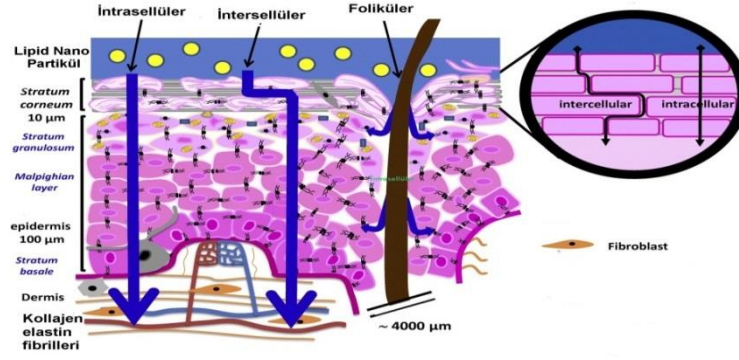
Nanopartiküllerin sektörel kullanımı yeni fırsatlar yaratmanın yanı sıra bazı riskler ve belirsizlikler de doğurmaktadır. Nanomateryallerin üretim ve

kullanımının artması ile artan sayıda işçi ve tüketici nanomateryallere maruz kalmaktadır. Bu, maruz kalma yollarıyla ilgili daha fazla bilgiye ihtiyaç olduğunu göstermektedir. İnsanlar solunum, yutma ve dermal yollarla nanoparçacıklara maruz kalmaktadır. Solunum, havadaki nanoparçacıklara maruz kalınan en yaygın yoldur. İşçiler, üretim sırasında nanoparçacıkları soluyabilirken, tüketiciler aerosol haline getirilmiş kozmesötikler (deodorant, parfümler, vb.) yoluyla nanoparçacıkları soluyabilir. Solunum sisteminde nanoparçacıkların depolanması, solunum epitel membranı ile etkileşimlerine bağlıdır.

Nanopartiküller, nazal sinirler yoluyla beyne gidebilir (olfaktör epitelyum yoluyla solunumdan sonra transsinaptik transport) ve sinir sistemine erişim kazanabilir. Boyutları nedeniyle, bu nanoparçacıklar kolayca kan akışı veya deriye erişebilir ve buralardan çeşitli organlara nakledilir. Yutma, nanoparçacıkların istemsiz bir şekilde elden ağıza nakilinden veya ağız veya dudakların yakınında uygulanan kozmetiklerden (örneğin ruj, dudak parlaticısı) oluşabilir. Nanoparçacıkların büyük parçaları sindirimden sonra hızla vücuttan dışarı atılır ancak farklı organlara giren parçacıklar vücut içinde kalabilir. Nanoparçacıkların sistemik dolaşıma girmesinin bir diğer yolu cilt tarafından emilimidir (Lohani et al., 2014).

#### **2.8.4 Nanopartiküllerin cilt emilimi**

Bir molekülün stratum korneum'u geçebileceği pasif yollar, interselüler, transselüler ve foliküler yollardır. Nanopartiküllerin deri yoluyla taşınması nanopartikülün ve araçların yapısı, fiziko-kimyasal özellikleri, maddenin yapısı ve cildin koşulları ile ilgilidir.



Şekil 2.8 Nanopartiküllerin emilim yolları (Toll et al., 2014).

Nanopartiküller iki gruba ayrılabilir:

- (1) Çözünebilir ve / veya biyolojik olarak çözünebilen nanopartiküller.
- (2) Suda çözülmeyen ve / veya biyolojik olarak çözünmeyen nanopartiküller.

Nanopartiküllerin deriden emilimi hemen gerçekleşmez, ancak belirli koşullar altında gerçekleşebilir. Kozmetik ürünlerinin normal deride kullanılması gerekmesine rağmen, sağlıksız deride de uygulandıkları bilinmektedir. Bu gibi durumlarda, cildin bariyer özellikleri bozulabilir (Toll et al., 2004).

### 2.8.5 Kozmetikte nanomateryal kullanma riski

Bazı araştırmacılar nanopartiküllerin deri ve sistemik dolaşım yoluyla istenmeyen şekillerde nüfuz ettiğini bildirmişlerdir. Güneş koruyucu ürünlerinde 10 ila 200 nm arasında değişen çinko oksit ve titanyum dioksit nanopartiküllerin sağlam bir cilde nüfuz edebildiği ve istenmeyen biyolojik hasara yol açabileceği gösterilmiştir. Çinko oksit nanopartikülleri nöron kök hücreleri üzerindeki nörotoksitesi de (NSCs) *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bazı araştırmacılar tarafından titanyum dioksit nanopartiküllerin sitotoksitesi de bildirilmiştir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, titanyum dioksit nanopartiküllerin, sertoli hücrelerinde otofaji ve nekroz oluşturma potansiyeline sahip olduğu ve Zebra balıklarında spermatojenik hücreleri ve testiküler morfolojiyi ters yönde etkilediği gösterilmiştir. Bu nanopartiküllerin cildin daha derin katmanlarına ve genel



dolaşıma nüfuz etmesi, ciltte egzama, akne, yara, sedef hastalığı ve UV hasarını önemli ölçüde artırır.

Nanomateriyallere genel olarak solunum, yutma ve dermal emilim yoluyla maruz kalınmaktadır. Nanomateriyallerin bazı çevresel riskleri de vardır. Nanomateriyallerin su, hava ve toprağa üretim, kullanma veya bertaraf sırasında yeterli miktarlarda bırakılması bazı çevresel sorunlara neden olabilir. Örneğin, antibakteriyel etkileri olan nanomateriyaller, doğal ekosistemlerdeki yararlı bakteriyel sistemi etkileyebilir. Nanomateriyallerin bazıları, kadmiyum veya petrokimyasallar gibi hava kirleticileri ile bağ kurabilir ve bunları uzun mesafelere taşıyabilir. Sonuç olarak, tüm bu konular nanokozmetiklerin formülasyonu, kullanımı ve bertarafı sırasında dikkate alınmalıdır (Shokri, 2017). Toksikolojik olarak genel geçerliliği kabul edilmiş olan testlerin yapılması gerekmektedir (Şekil 2.9).

Gelişen ve Yeni Tanımlanan Sağlık Riskleri Bilimsel Komitesinin (SCENIHR,2007) görüşleri, nanoteknoloji ürünlerinin olası olumsuz sağlık ve çevresel etkilerini değerlendirmek için mevcut risk değerlendirme yöntemlerini ele almaktadır ve ayrıca nanomateriyellerin araştırılmasında nanomateriyallerin spesifik özelliği, neden olabilecekleri potansiyel yaralanma mekanizmalarını belirlemek için yeni test stratejileri gerekmektedir. Nanomateriyallerin güvenliği için değerlendirilen ana parametreler aşağıdaki gibidir (Raj et al., 2012).



Şekil 2.9 Geçerliliği kabul edilmiş *in vitro* testler (Raj et al., 2012).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Peptit Sentezi

Bu tez çalışması kapsamında, tasarlamış olduğumuz MMP-12 enzimine özgü inhibitör peptitlerimiz Gen Script firması (NJ, USA) tarafından sentezlenmiştir. Üç adet peptit tasarlanmış ve aşağıdaki şekilde adlandırılmıştır.

Peptit 1 = *PEP1*

Peptit 2 = *PEP2*

Peptit 3 = *PEP3* [(Dervatyl<sup>TM</sup>, dermal renovation peptide)] olarak Türk Patent tarafından 20160642 no ile tescillenmiştir.

Peptitlerin;

- ✓ Saflık oranı %98 dir.
- ✓ İyi Üretim ve Laboratuvar Uygulamaları (GMP / GLP) ile üretilmiştir.
- ✓ Kozmetik amaçlı olarak sentezlenmiştir.
- ✓ Asetat oranı  $\leq 15$  dir.
- ✓ Su oranı  $\leq 5$  dir.
- ✓ Peptit içeriği  $\geq 80$  dir.

Peptit sentezinde Fmoc katı fazda peptit sentezi yöntemi kullanılmıştır. Fmoc (9-florenilmetoksikarbonil) yönteminde, ilk olarak Fmoc korumalı amino asit reçine üzerine bağlanır. Ardından Fmoc koruma grubu piperidin ile amino asitten koparılır ve yıkama yapılır. Diziye uygun bir şekilde bir sonraki Fmoc korumalı amino asit, aktivatörler ve aktivatör bazlarla beraber ortama eklenir. Aktivatörler amino asidin karboksil ucunu aktive ederek yeni amino asidin reçine üzerindeki amino asidin amino grubuna bağlanmasını sağlar. Tekrardan yıkama yapılır ve ortama piperidin eklenerek Fmoc koruma grubu uzaklaştırılır. Sonraki amino asitler de aynı işlem akışına göre birbirlerine birbirlerine bağlanırlar. Sentez bittikten sonra trifloroasetik asit (TFA) ile muamele edilerek reçineden uzaklaştırılır. Aynı

zamanda, amino asit yan zincirleri üzerindeki koruyucu gruplar da ham lineer peptidi çıkararak çıkarılır. Ters fazlı HPLC ile tek basamaklı saflaştırma yapılır. % 95 'den büyük oranda peptit elde edilir (Mende and Seitz, 2011).

### 3.2 MMP-12 İnhibitör Tarama Testi (Kolorimetrik)

Tasarlanmış olduğumuz PEP1, PEP2 ve PEP3 oligopeptitlerinin MMP-12 üzerinde ki inhibisyon düzeyleri Ridless ve ark.'nın (1979) yöntemine göre yapıldı.

Abcam MMP-12 İnhibitör tarama testi (ab139441) kromojen substrat (Ac-PLG-[2-mercapto-4-methyl-pentanoyl]- LG-OC2H5) olarak tiyopeptit kullanılmasıyla MMP-12 inhibitörlerini belirlemek için dizayn edilmiştir. MMP-12 bölünme bölgesi peptit bağı tiyopeptitte bir tiyoester bağı ile yer değiştirilir. Bu bağın bir MMP ile hidrolizi bir sülfhidril grubunu üretir, bu grup DTNB [5,5'dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] ile reaksiyona girerek 2-nitro-5-tiyobenzoik asit oluşturur. Bu da 412 nm ( $\epsilon=13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , pH 6.0 ve üzeri) ile saptanabilir. Kit MMP-12 inhibitör belirlenmesi için kullanışlıdır. Pozitif kontrol MMP inhibitörü olarak (NNGH) proN-İzobütil-N- (4-metoksifenilsülfonil) glisil hidroksamik asit kullanıldı.

### Yöntem

MMP substrat ve MMP inhibitörü oda sıcaklığında DMSO içinde çözüldü. Deney tamponu içinde MMP inhibitörü (NNGH) 1/200 oranında seyreltildi. MMP substratı 1/25 oranında deney tamponu ile seyreltildi. MMP-12 enzimi 1/285 oranında deney tamponu ile seyreltildi. Çizelge 3.2.1 de belirtilen oranlarda 96 kuyucuklu hücrelere uygulama yapıldı. Enzim inhibitör etkileşimi için 96 kuyucuklu hücreler 1 saat boyunca 37 °C de inkübe edildi. Her bir örnek en az 3 er kez tekrarlandı. İnkübasyon sonunda 412 nm de 10 dakika boyunca ölçüm alınarak değerlendirme yapıldı. İnhibitör konsantrasyonu olarak 6,5 ve 13  $\mu\text{M}$  kullanılarak inhibisyon düzeyi belirlendi.

**Çizelge 3.1** MMP12 inhibitör testi uygulama yöntemi. \* PEP1, PEP2, PEP3

Örnek	Deney tamponu	MMP12 (35mU/µL)	Inhibitor (6.5 µM)	Substrate (1mM)	Total Hacim
Blank (kör)	90 µl	0 µl	0 µl	10 µl	100 µl
Kontrol	70 µl	20 µl	0 µl	10 µl	100 µl
MMP İnhibitör	50 µl	20 µl	20 µl	10 µl	100 µl
Test inhibitör*	50 µl	20 µl	20 µl	10 µl	100 µl

412 nm de 10 dakika boyunca alınan absorbans değerine karşı doğru grafiği çizildi. Enzim inhibisyonu, absorbans–zaman grafiğinde ki doğrunun eğimi (V=slope) bulunarak aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

$$\% \text{ Enzim inhibisyonu} = \frac{V \text{ kontrol} - V \text{ inhibitör}}{V \text{ kontrol}} \times 100$$

### 3.3 Hücre Kültürü Deneyleri

PEP1, PEP2 ve PEP3 oligopeptitlerinin MMP-12 inhibisyonu üzerindeki etkilerini hücre düzeyinde belirlemek için, ATCC'den temin edilen insan deri fibroblast hücre hattı HS68 (ATCC CRL-1635) kullanıldı. Hücreler, %10 FBS (fetal sığır serumu) ve %2 glutamin ile desteklenmiş DMEM (dulbecco's modified eagle ortamı) (ATCC Kat No: 30-2006) besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin önerdiği şekilde hücrelerin tripsinasyonu için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanıldı. Hücre yoğunluğuna bağlı olarak pasajlama oranı 1:2 veya 1:3 olarak belirlendi. Hücreler %95 besiyeri ve %5 DMSO içeren “dondurma” besiyeri içerisinde kısa süreli olarak -80 °C derin dondurucuda uzun vadede sıvı azot tankları içerisinde saklandı (Hwang et al., 2012).

#### 3.3.1 %10'luk FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikro çevreyi sağlayan besleyici solüsyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklemektedirler. Bu amaçla; 500 mL'lik besiyeri içerisine 50 mL FBS, 5 mL esansiyel olmayan amino asit

solüsyonu, 10 mL L-Glutamin, 2,5 mL sodyum piruvat ve 1 mL antibiyotik çözeltisi ilave edilerek %10'luk taze besiyeri hazırlandı.

### **3.3.2 Dondurma besiyerinin hazırlanması**

Hücrelerin uzun süre saklanabilmesi için -80 °C derin dondurucu veya -196 °C de azot tankı kullanılmaktadır. 97,5 mL FBS'nin içine 2,5 mL DMSO (Dimetil sülfoksit) sıvısı eklenerek dondurma besiyeri hazırlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

### **3.3.3 Peptit dozlarının ayarlanması**

PEP3 ultra saf su ile çözüldü, 100 ng /ml, 500 ng /ml, 1 µg/ml 10 µg/ml, 20µg/ml olacak şekilde seyreltildi.

## **3.4 Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi**

HS68 hücreleri proliferasyon, elisa, western blot ve immunfloresan boyama deneyleri için, 96 ve 6 kuyucuklu platalere bölünerek uygun büyüme ortamı oluşturuldu.

### **3.4.1 Hücrelerin tripsinizasyonu**

Petri kabına yapışan hücreler sürekli olarak büyüme eğilimi gösterirler. Hücrelerin pasajlanması için tripsinizasyon gereklidir. Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir.

Bu amaçla, petri kabını en az %70 oranında dolduran hücreler, hücre kültürü kabinine alındı. Burada petri kaplarındaki besiyeri pipetör ile çekilerek atıldı. %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımından büyük petri (150x25 mm) için 4 mL küçük petri (100x20 mm) için 2 mL eklendi. Mikroskop ile kontrol edilerek tüm hücrelerin kalkmaları beklendi. Kalkan hücreler %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri ile falkon tüplere aktarıldı ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısımdaki süpernatant atıldı. Dipte kalan hücre peleti diğer işlemler için kullanıldı.

Tripsinasyon işlemleri ile santrifüj sonrası falkon tüpte elde edilen hücreler üzerine 10 mL %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek iyice karışması sağlandı. Daha sonra ependorf tüpün içerisine 900 µL %10'luk DMEM besiyeri, 100 µL de içerisinde hücre bulunan besiyerinden eklenerek 10 kat sulandırıldı. Bu hücre karışımı Thoma lamında sayıldı.

Proliferasyon ve toksikolojik deneyleri için hücreler, 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuk başına  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde bölündü. Elisa ve Western blot deneyleri için hücreler, 6 kuyucuklu plaklara her kuyucuk başına  $2 \times 10^5$  hücre olacak şekilde bölündü.

### 3.5 Hücre Proliferasyonu Testi

Proliferasyonunu testi, hücrelerdeki DNA'ya BrdU (5-bromodeoksiüridin) bağlanmasının saptanması ile ölçülen bir test yöntemidir (ROCHE, 2012). Prolifere olan hücrelerin DNA'sındaki timidinle BrdU yer değiştirmektedir. S fazındaki hücrelerin BrdU ile işaretlenmesi ve bu işaretli hücre grubunun hücre siklusundaki ilerlemesinin izlenmesine dayanmaktadır.

PEP3 oligopeptidinin hücre çoğalması üzerindeki etkilerini incelemek için doz taraması yapıldı. HS68 hücreleri  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara bölündü ve yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyerleri çekilerek her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda ki (1 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml) PEP3, 100 µl/kuyucuk olacak şekilde uygulandı. 72 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Süre sonunda, anti-BrdU-peroksidaz antikoru eklendikten sonra oluşan immün kompleksler spektrofotometrede 370 nm de ölçülerek değerlendirildi.

Roche marka Cell Proliferation Elisa BrdU (kolorimetrik) Version 16 kiti ile ölçümler her bir konsantrasyon 5 kez tekrar edilerek yapıldı. Instad 10.0 istatistik programında Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak verildi.

### **3.6 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin'nin Western Blot Analizi ile Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi**

Western Blot (WB) testi 1979 yılında Towbin tarafından tanımlanan moleküler biyolojide kullanılan protein analiz yöntemidir (Towbin et al., 1979). HS68 hücrelerinin 48 boyunca, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarda PEP3 ile uygulanmasından sonra hücrelerdeki kollajen I, IV, elastin ve fibronektin miktarları ölçülmüştür.

#### **3.6.1 Hücre lizatların hazırlanması**

Hücre lizatının amacı hücre içinde bulunan, moleküllerin hücre dışına çıkartılarak analiz için uygun şartların oluşturulmasıdır. PEP3 uygulanması ile hücre içinde kol I ve IV, elastin ve fibronektin miktarlarını belirlemek için aşağıda belirtilen solüsyonlar kullanılmıştır.

Hücre lizis tamponu: Biosource firmasından temin edilen lizis tamponu kullanıldı.

Proteaz/Fosfataz inhibitör kokteyli: Thermofisher Scientific (Rockford, IL, USA) firmasından temin edilen 100X inhibitör kokteyli, çalışma sırasında hücre lizis tamponu ile 1X'e dilüe edildi.

#### **Yöntem**

HS68 hücreleri, tripsin-EDTA yardımıyla buldukları flaskın yüzeyinden kaldırıldı ve 100mm çapındaki steril kültür petri kaplarına aktarıldı. Hücreler, %80 yoğunluğa gelinceye kadar rutin olarak beslendi. Daha sonra PEP3 muamelesi için ilgili petrilere 10 µg/ml ve 20 µg/ml stok solüsyonlardan 40 µl eklendi. Hücreler PEP3 ile 1.5 saat boyunca 37 °C'lik inkübatörde bekletildi.

Süre sonunda 1 kez 1X PBS ile yıkanan hücreler, 100 µl lizis tamponu içerisinde hücre toplayıcı yardımıyla petrilere alınarak sonikasyon yoluyla parçalandı. 10000 x g ve 4 °C'de 5 dakika santrifüj sonucunda elde edilen



supernatan temiz bir tüpe aktarıldı. Immunoblotlama aşamasında her numuneden eşit miktarda proteinin yüklenebilmesi için, supernatandaki protein miktarı kantifiye edildi ve bu numuneler immunoblot analizi için kullanıldı.

### **3.6.2 Protein miktar tayini**

Bradford yöntemi, proteinlerin asidik ve bazik grupları ile etkileşerek renk oluşturması prensibine dayanmaktadır. Oluşan mavi renk şiddeti, 595 nm'deki dalga boyunda ölçülerek proteinlerin miktarı tespit edildi (Bradford, 1976).

### **3.6.3 Kollajen I, IV, elastin ve fibronektin'nin immunoblot analizi**

HS68 hücrelerinde PEP3 muamelesi sonrasında oluşan Kollajen I, IV, elastin ve fibronektin protein ekspresyonundaki değişiklikler immunoblotlama yöntemi ile gösterilmiştir. Bu yöntem, elektriksel ortamda molekül ağırlıklarına göre jelde ayrışan proteinlerin, membrana aktarılarak önce spesifik antikoları ile sonra da bunu tanıyan ve belirli bir substrat ile reaksiyon verebilen ikincil bir antikora ile bağlanması sonucu oluşan yanıtın filmde gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. Bu amaçla proteinler önce SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile ayrışmalı, sonra ilgili primer antikoru ile blotlanmalıdır.

#### **Kullanılan kit ve solüsyonlar**

Ayrışma jeli tamponu (Resolving Buffer): 1.5 M Tris (pH 8.8) + 14 mM SDS  
9.085 g Tris, 50 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 8.8'e ayarlanan tampona 0.2 g SDS eklenerek solüsyon hazırlandı.

Yükleme jeli tamponu (Stacking Buffer): 0.5 M Tris (pH 6.8) + 14 mM SDS  
3.025 g Tris, 50 ml distile suda çözüldü. HCl ile pH 6.8'e ayarlanan tampona 0.2 g SDS eklenerek solüsyon hazırlandı.

Akrilamid – Bisakrilamid Solüsyonu: %40 (v/v) oranında kullanıma hazır olarak BioRad'dan (Hercules, CA, USA) temin edildi. %10 (w/v) Amonyum persülfat (APS): 0.1 g amonyum persülfat 1 ml distile suda çözünerek hazırlandı.

TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilediamin): Akrilamid ve bisakrilamidin polimerizasyonunu katalizlemesi amacıyla kullanılan Temed solüsyonu, kullanıma hazır olarak Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edildi.

Yükleme Tamponu (Loading Dye): 2X olarak BioRad'dan (Hercules, CA, USA) kullanıma hazır olarak temin edildi.

Elektroforez Tamponu (Running Buffer): 5X stok olarak hazırlandı. 15 gr Tris, 72 gr Glisin ve 5 g SDS tartılıp 1L distile suda çözüldü. Kullanım aşamasında ise 5X'lik bu stok solüsyon, distile su ile 1X'e seyreltilti.

Blotlama Tamponu (Blotting Buffer): 10X stok olarak hazırlandı. 30.3 g Tris, 144 g Glisin ve 10 g EDTA tartılıp 1L distile suda çözüldü. Kullanım aşamasında ise 10X'lik bu stok solüsyon %20 metanol ile 1X'e seyreltilti. Merck'den (Darmstadt, Germany) temin edilen metanol, transfer sırasında membranın şişmesi ve yapışan proteinlerin korunabilmesi amacıyla blotlama tamponuna eklendi.

PBS-T (%0.1 Tween 20): 10X stok PBS solüsyonu hazırlandı. 87.6 g NaCl, 2.76 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (monobazik), 11.36 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (dibazik), 1.87 KCl tartılıp 1L distile suda çözüldü. Hazırlanan bu 10X'lik stok solüsyon, kullanılmadan önce distile su ile 1X'e seyreltilti. 1L için 1 ml Tween-20 eklenerek PBS-T solüsyonu hazırlandı.

%5 Bloklama Solüsyonu: 1 g yağsız süt tozu, 20 ml TBS-T içerisinde taze olarak hazırlandı.

Kollajen I, IV, elastin ve fibronektin'nin primer antikor (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) solüsyonları: 1:1000 oranında PBS-T içerisinde taze olarak hazırlandı. Her iki antikor da anti-rabbit, poliklonal karaktere sahiptir. Sekonder Antikor (Cell Signaling Technology, USA) Solüsyonu: IgG anti-rabbit sekonder antikor, 1:5000 oranında PBS-T içerisinde taze olarak hazırlandı.

### **SDS-PAGE Elektrofrez Yöntemi**

İki fazlı akrilamid jel üzerinde elektrofrez gerçekleştirildi. %10'luk ayrıştırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli, çizelge 3.2' de belirtildiği şekilde hazırlandı.

**Çizelge 3.2** Ayrıştırma ve yükleme jellerinin hazırlanması.

		<b>Ayrıştırma Jeli (%10)</b>	<b>Yükleme Jeli (%5)</b>
<b>Distile Su</b>		2.45 ml	3.1 ml
<b>Tris-HCl tamponu</b>	pH 8.8	1.25 ml	-
	pH 6.8	-	1.25 ml
<b>Akrilamid/Bisakrilamid</b>		1.25 ml	0.625 ml
<b>%10 APS</b>		0.05 ml	0.05 ml
<b>Temed</b>		0.002 ml	0.005 ml

Cam plakalar %70'lik alkol ile temizlenerek, standlara yerleştirildi ve plakalar arasına ayrıştırma jeli arkasından yükleme jeli dökülerek, oda ısısında sırasıyla 50 ve 20 dakika süreyle donmaya bırakıldı.

Protein miktarları Bradford yöntemiyle önceden tayin edilen numuneler, her bir kuyucukta 35 µg olacak şekilde, 2X yükleme tamponu ile 1:1 oranında seyreltildi. Bu aşamada ilgili tüplere final konsantrasyonu 30mM olacak şekilde DTT eklendi. 95 °C'lik termoblok içerisinde 8 dakika hazırlanan numuneler inkübe edildi. İlk kuyucuğa molekül ağırlıkları bilinen proteinlerden oluşan markır, diğerlerine de numuneler jele yüklenerek elektrofrez 120 V'a ayarlanarak elektrofrez işlemi gerçekleştirildi.

### **Immunoblotlama**

Elektrofrez sonunda cam plakaların arasından alınan jel, 1X transfer tamponu içerisinde nitroselülöz membran ile sandviçlendi. Sandviç için, katottan anota doğru sırasıyla sünger, whatmann kağıdı, jel, nitroselüloz membran, whatmann kağıdı ve sünger sandviç aparatı içerisinde üst üste yerleştirildi ve aparat sıkıca kapatıldı. Hazırlanan sandviçin anot kutbunun anotta, katot kutbunun da katotta olmasına dikkat edilerek transfer tankına yerleştirildi. Transfer işlemi 1X transfer tamponu içerisinde +4 °C ve 85 V'da, 4,5 saat süresince gerçekleştirildi.

Transfer sonucunda sandviç aparatının içinden alınan membran, önce non-spesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla %5'lik bloklama solüsyonu ile oda ısısında 1 saat, daha sonra kollajen I, IV, elastin fibronektin'ne spesifik primer antikor ile +4 °C'de gece boyunca, son olarak ise HRP işaretli sekonder antikor ile oda ısısında 1 saat süresince inkübe edildi. Süre sonunda membrandaki bantlar, kolorimetrik olarak görüntülendi.

### **Bantların yoğunluk analizi**

Image J – Versiyon 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı ile analiz edildi.

### **3.7 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin'nin İmmunfloresan Yöntemi ile Hücre İçi Gösterilmesi**

Floresans veren özel boyalı konjuge antikorlarla, spesifik antijenlerin birleşmesi (aglutinasyon) ve floresan mikroskopta incelenmesi esasına dayanan bir test yöntemidir. PEP3 ile muamele edilen HS68 hücre içi protein miktarlarını floresan ışığa ile tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır.

### **Yöntem**

Hs68 hücreleri PEP3 ile 20 µg/ml olacak şekilde muamele edildi ve lamlara aktarıldı. 48 saat boyunca etüvde inkübe edildi. Hücreler 1:1 soğuk aseton-metanol karışımı ile +4 derecede 5 dk fikse edildi. Fazla fiksatif uzaklaştırıldı ve PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. UV Blok ile 5 dk bloklandı.

Hücreler, primer antikorlar ile +4 °C de gece boyu inkübe edildi. COL1A1 (H-197) sc-28657 Rabbit Poliklonal (1:100), COL4A2 (T-15) sc-70246 Rabbit Poliklonal (1:100), Elastin (H-300) sc-25736 Rabbit Poliklonal (1:100), Fibronektin (H-300) sc-9068 Rabbit Poliklonal (1:100). Ertesi gün, antikor uzaklaştırılıp PBS ile 3x5 dk yıkandı.

Florasans işaretli sekonder antikor (**Goat anti-rabbit IgG-FITC**, Santa Cruz, sc-2012, (1:500) ile 1 saat oda ısısında karanlıkta inkübe edildi, PBS ile 3 kez , 5 dk

yıkandı. DAPI li VectaShield mounting medium ile kapatıldı. (Mounting Medium with DAPI ,Vector Labs, H-1500). Floresan mikroskopda 40x ile görüntülendi.

### **Floresan ışımaya yoğunluğu analizi**

Analizler Image J – Versiyon 1.36 (National Institute of Health, Maryland, USA) dansitometre programı ile yapıldı. Instad 10.0 istatistik programında Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons Testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata (SEM) olarak verildi.

### **3.8 Katı Lipit Nanopartiküllerin Hazırlanması**

Kozmetik amaçlı olarak katı lipid nanopartikül sistemi biyobozunur ve biyoyoumlu sistemler olması, düşük sistemik toksik ve sitotoksik etkiye sahip olmaları, uzatılmış etkili kontrol sistemler olması, hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddelerin hapsedilmesi, büyük ölçekte ve düşük maliyette üretilmesi ve aynı zamanda UV bloker olarak görev yapması dolayı nedeniyle seçildi.

Tezimiz de, sanayi ölçeğinde üretilebilmesi, daha kontrollü karışım elde edilmesi ve partikül büyüklüğünün ayarlanabilir olmasından dolayı mikro akışkan yöntem [mikro fluidik sistem (MF)] ile nanopartikül sentezlendi.

Mikro akışkan sistemler mikro boyutlardaki elektriksel ve mekanik bileşenlerden oluşan cihazları ifade eder. Mikro akışkan teknolojisinde oluşturulan sistemlerde mikro ve nano hacimlerdeki sıvılar, mikrometre boyutlarındaki kanallar aracılığıyla taşınıp iletilebilmektedir. Kanallar içerisinde bulunan mikroçipler sayesinde hızlı bir şekilde karışım yaparak, ölçeklenebilir bir üretim metodu oluşturmaktadır. MF sistemi belli basınç ve akış hızının kontrol edilmesiyle mikro kanallardan geçen solüsyonların hızlı bir şekilde geçerek hidrodinamik açıdan daha stabil yapıları ortaya çıkartan sistemlerdir (Zhigaltsev et al., 2012).

#### **3.8.1 Peptit yüklü-KLN hazırlanması**

Tez kapsamında KLN üretiminde solvent enjeksiyon yöntemine ek olarak mikro fluidik (mikro akışkan) yöntemi kullanıldı. Solvent enjeksiyon yöntemi ile

hazırlanan lipitler, peptidimiz ile karıştırılarak mikro kanallara sahip MF cihazı ile belli basınç ve sıcaklık ve akım hızında geçirilerek istenilen nm de lipit nano partikül elde edilmesine dayanmaktadır. Elde edilen nanopartiküllerde etken madde kapsüllemesinin yüksek olmasından dolayı, endüstriyel üretim açısından önem arz etmektedir (Zizzari et al., 2017).

Solvent enjeksiyon yönteminde; organik solventlerin kullanılması, kolay olması ve komplike bir ekipman gerektirmeden hızlı üretim sağlaması gibi avantajları vardır. Uygulaması basit olan bu yöntemde lipit suda çözünen bir organik solventte çözülür (etanol, aseton, isopropanol gibi) bu solüsyon suya şırınga ile aynı zamanda karıştırma işlemi uygulanırken enjekte edilir ve lipit su ile temas ettiğinde nanopartikül formuna çökerek nanopartikül oluşumu gözlenir. (Charcosset et al., 2015).

### **Yöntem**

1,2-Dioleoil-3-trimetilamonyum-propan (DOTAP) ve N-palmitoil-sfingosin-1-süksinil [metoksi (polietilen glikol) 2000] (Ceramide-PEG2000) Avanti Polar Lipids, Inc'den (Alabaster, AL) temin edildi. Yumurta fosfatidilkolin (yumurta PC), Lipoid'den (Newark, NJ, ABD) elde edildi. Kolesterol (Chol) ve HEPES tamponu diğer kimyasal maddeler ve reaktifler Sigma-Aldrich Chemical Co.'dan (St. Louis, MO, ABD) temin edildi.

Katyonik lipit çözeltisi (KLN) oluşturmak için; çizelge 3.3'de belirtildiği şekilde DOTAP/yumurta PC/Chol/Ceramide-PEG2000 (45:18:35: 2, mol/mol), karışımı 5 ml etanolde çözüldü (Yu et al., 2011).

**Çizelge 3.3** KLN formülasyonu hazırlama oranları.

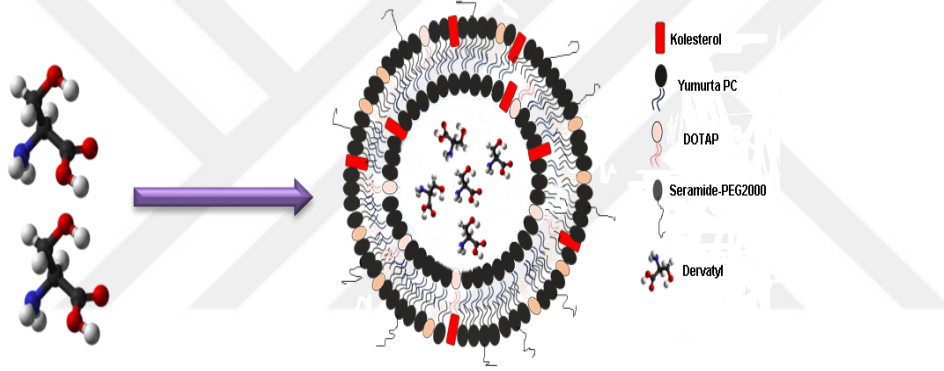
<b>Kimyasal Madde</b>	<b>mol/mol</b>	<b>mg</b>
DOTAP	45	31,4
Yumurta PC	35	14
Kolesterol	2	13,5
Ceramide-PEG2000	18	5,3

Çözünmüş olan lipitler ucu kesik enjektör yardımı ile 10 ml HEPES çözeltisi (20 mM HEPES, pH 7,4) içerisine manyetik karıştırıcı üzerinde, ekleme hızı dakika

da 1,5 ml olacak şekilde eklendi (Charcosset et al., 2015). Ekleme den sonra 15 dakika daha karışması sağlandı. Karışım sonunda etanol, 2 saat süreyle oda sıcaklığında HEPES tamponuna (20 mM HEPES, pH 7.4) karşı rejenere selüloz membran (MWCO: 1000) ile diyaliz edilerek uzaklaştırıldı. KLN'ler, 500 µg/ml olacak şekilde HEPES ile seyreltildi.

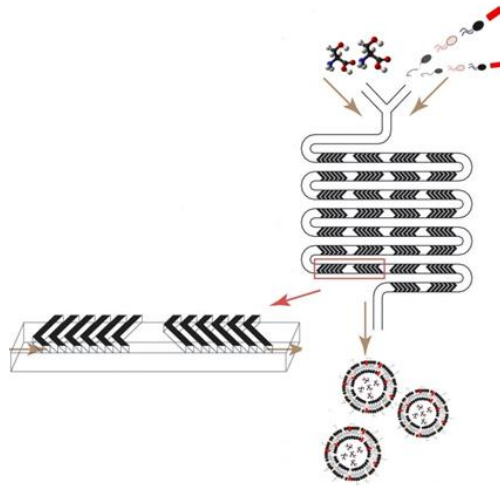
Peptit çözeltisi oluşturmak için; PEP3 ml de 50 µg olacak şekilde HEPES tamponu ile çözüldü. PEP3, 50 µg/ ml olacak şekilde HEPES ile seyreltildi.

Mikro fluidik (mikro akışkan) sistem hazırlığı (mikro-mix tekniği) (Phapal and Sunthar, 2013) için; etanol lipit enjeksiyon metodu ile elde edilen KLN ile PEP3 1:1 (v/v) oranında karıştırıldı.



Şekil 3.1 PEP3 yüklü KLN oluşumunun şematik gösterimi.

Karışım MF sisteminden 13,000 PSI basınç altında geçirilerek KLN oluşumu sağlandı (Şekil 3.1, 3.2).



Şekil 3.2 MF sistemi ile KLN oluşumunun gösterilmesi.

### 3.8.2 KLN partiküllerinin karakterizasyonu

Yeni nesil kolloidal taşıma sistemi olarak KLN'lerin, partikül büyüklüğü dağılımı ve fizikokimyasal özelliğini belirlemek partikülün karakterizasyon hakkında bilgi vermektedir. Partikül boyutu ve boyut dağılımı, nanopartikül sistemlerinin en önemli karakteristik özelliklerinden birisidir. Bu özellik nanopartikül sistemlerinin *in vivo* dağılımını, toksisitesini, hedeflenebilme yeteneğini, nanopartiküllerin kararlılığını, ilaç yükleme kapasitesini ve ilaç salınımı gibi önemli özelliklerini belirler (Xu et al., 2011).

#### 3.8.2.1 Partikül boyutu ve PDI değeri ölçümü

Tez çalışmasında hazırlanan nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve PDI (Poly dispersity index) ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapıldı. Ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25 °C ve ışık saçılım açısı 90 °C olarak ayarlandı.

#### 3.8.2.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile görüntüleme çalışmaları

Nanopartikül içeren çözeltilerden 3 damla alındı. Örnekler 300 kere ızgaralı bakır grid üzerine bırakılarak 2 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaları beklenildi. TEM görüntüleri JEOL JEM 1400 Plus TEM cihazı (Tokyo, JAPONYA) ile 120 kV çalışma voltajında elde edildi ve dijital olarak fotoğrafları çekildi.

### 3.9 Enkapsülasyonun Değerlendirilmesi

Hazırlanan formülasyonların yükleme etkinliği direkt olarak nanopartikül içinde bulunan etkin madde miktarından veya dolaylı olarak serbest halde bulunan ve nanopartikül içerisine girmeyen etkin madde miktarının tayini ile hesaplanabilir. Süpernatant da serbest halde bulunan yüklenmemiş etkin madde miktarının tayininde LC-MS/MS (Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometri Sistemi) (Quantum Max UHPLC/MS/MS) cihazı kullanıldı. Giorgianni ve ark' larının (2004) yöntemine göre peptit analizi yapıldı.



Peptit analizi ve tespiti Thermo Scientific Accela UPLC, Thermo Scientific-TSQ Quantum Access Max (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) sistemi ile gerçekleştirildi. Kromatografik değerlendirmeler Xcalibur yazılımı kullanılarak yapıldı. Kromatografik ayırım için analitik kolon olarak Hypersil Gold RP C18 (1.9µm), 50x2.1 mm, (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA) HPLC kolonu kullanıldı. Çözgen olarak metanol kullanıldı. İyonlaştırıcı olarak da formik asit ve amonyum format kullanıldı

Cihaz çalışma koşulları da aşağıda belirtildiği gibi ayarlandı,

Kolon fırın sıcaklığı: 40°C,

Enjeksiyon hacmi: 10 µL

Kapiler sıcaklığı: 270 °C

Buharlaştırma sıcaklığı: 50 °C

Auxiliary gaz basıncı (Arb): 20

Sheath gaz basıncı (Arb): 50

Sprey Voltaj (V): ±3500

Süpernatantın KLN'ler den ayrıştırılması ultra santrifüj ile yapıldı. Santrifüj işlemi (Becman Coluter's Optima TL) 50000 g de 30 dakika boyunca +4 °C de yapıldı. Bu süre sonunda elde edilen süpernatant içerisinde bulunan PEP3 miktarı *LC-MS/MS ile belirlendi*. Enkapsülasyon etkinliği (% EE) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

% EE=Toplam etken madde miktarı-Yüklenmemiş etken madde miktarı x100

Toplam etken madde miktarı

### 3.10 KLN Liyofilizasyon Çalışmaları

KLN'lerin fiziksel ve kimyasal stabilitesini korumak için kurutma (liyofilizasyon) işlemi yapılmaktadır. Liyofilize halde partikül büyümesi ve bozunumu azalmaktadır. Bu amaçla kriyoprotektanların (dondurma işlemi koruyucuları) kullanılması gerekmektedir (Date et al., 2010).

Stabilite çalışmaları için nanopartiküller -86 °C de 48 saat boyunca soğutmalı kurutma yöntemi (liyofilizasyon) ile (Labconco Freeze Dreyer, USA) farklı konsantrasyonlardaki kriyo protektantlar [(% 5 ve % 10 fruktoz, (% 5 ve % 10 mannitol, (% 5 ve % 10 sukroz )] ile kurutuldu (Soares et al., 2013). Fruktoz, mannitol ve sukroz MERCK firmasından temin edildi. Liyofilizasyon işleminin ve kriyoprotektanların hazırlanan KLN üzerine etkisi partikül büyüklüğü ve PDI değerleri ölçülerek değerlendirildi.

#### 3.10.1 Liyofilize edilmiş KLN'lerin stabilite çalışması

Uluslararası İlaçların İnsan Kaynaklarına İlişkin Teknik Gerekliliklerin Uyumlaştırılması Konseyi (ICH) protokolleri gereği mannitol ile kurutulan nanopartiküllerin,  $4 \pm 2$  °C/60  $\pm$  5% nem,  $25 \pm 2$  °C/60  $\pm$  5% nem ve  $40 \pm 2$  °C/75  $\pm$  5 nem koşullarında stabilite çalışmaları yapıldı. (EMA, 2003). Liyofilize KLN'ler, 3 ve 9 ay sonra redisperse edilerek, partikül büyüklüğü ve PDI değerleri açısından incelendi.

### 3.11 PEP3 yüklü KLN'nin Kozmetik Amaçlı Formülasyonu

*In vitro* difüzyon çalışmaları ve *in vivo* klinik etkinlik çalışmaları için PEP3 yüklü KLN mannitol ile kurutulduktan sonra jel yapıda formüle edildi

Jellerin hazırlanmasında çok çeşitli polimerler kullanılmaktadır. İlaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılan jel yapıcı maddelerin saf olmaları, formülasyondaki etkin maddeler ve yardımcı maddelerle geçimli olmaları, düşük konsantrasyonda kullanılmaları, ekonomik açıdan uygun, kolay temin edilebilir

olmaları ve reolojik açıdan stabil olmalarından dolayı genellikle KLN içeren formülasyonlarda kullanılmaktadır.

Tez kapsamında Lucas Meyer firmasında temin edilen Lecigel ürün adı ile ticari satışı yapılan jelleştirici ajan olarak kullanıldı. Lecigel, sodyum akrilat kopolimer ve lesitin karışımı bir üründür. Sodyum akrilat kopolimer jel yapıcı ajan, lesitin ise penetrasyon arttırıcı olarak kullanılmaktadır.

Mikrobiyolojik açıdan formülasyonun korunması için koruyucu olarak Akema firmasından Kem Diol ticari adı ile satışa sunulan fenoksietanol ve kapril glikol içeren kimyasal kullanıldı. Formülasyon içeriği çizelge 3.4’de verildi. Formülasyona “F1” adı kullanıldı.

**Çizelge 3.4** F1 formülasyonu % ağırlıkça miktarları.

No	Kimyasal adı	A/A % (ağırlıkça)
1	Ultra saf su	96,8
2	Leci gel	1
3	PEP3 yüklü KLN+ Mannitol	1
4	Kem Diol	1,2
5	Ph ayarlayıcı % 18 NaOH	Yeteri kadar

Lecigel ultra saf suya %1 (a/a) konsantrasyon da olacak şekilde 1500 rpm’de ufak porsiyonlar halinde yavaşça ilave edilip 20 dakika boyunca oda sıcaklığı koşullarında Heidolph marka karıştırıcı ile homojen bir görünüm elde edinceye kadar karıştırıldı. Karıştırıcı hızı 500 rpm’e düşürülerek PEP3 yüklü KLN+mannitol eklendi 10 dakika daha karıştırıldı. Kem Diol eklendikten sonra, % 18’lik NaOH ile pH 5,5 olarak ayarlandı.

*In vitro* difüzyon çalışmaları ve *in vivo* testler için F1’e “Hücre Bazlı Cilt Yapılandırma Serumu” (Cellular Remodelling Serum) adı verildi.

### 3.12 *In Vitro* Transdermal Difüzyon Çalışması

Hazırlanmış olduğumuz formülasyonda bulunan PEP3'ün deriden emilim çalışması için deri modeline yakın korelasyon gösteren 25 mm (4,9 cm<sup>2</sup>) Strat-M membran (Merck Millipore, Cat no: SKBM02560) kullanılmıştır. *In vitro* difüzyon çalışmaları Franz difüzyon hücreleri (Şekil 3.3) kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.3 Franz difüzyon hücresi görünümü.

Strat-M Membran (Şekil 3.5), polietersulfon ve polyolefin olmak üzere iki tabaka içermektedir. İnsan derisinde ki meydana gelen değişimleri minimize ederek, hayvansal olmayan, sentetik transdermal difüzyon testi için uygun bir modeldir. Total membran kalınlığı 300 µm dir. İnsan derisine eşlenik bir model olarak oluşturulmuştur (Jimenez et al., 2004). Strat-M membrane, transdermal çalışmalarda insan derisine yakın korelasyon göstermiştir (Haq et al., 2018).



Şekil 3.4 Strat -M Membran yapısı.

## **Yöntem**

PBS çözeltisi (pH: 7,4): 250 mL 0.2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve 393.4 mL 0.1 M NaOH çözeltisi hazırlandı.

Franzcell cihazının sıcaklığı 32 °C ye ayarlandı. Donör kompartımanına -0.3 gram örnek (Hücre Bazlı Cilt Yapılandırma Serumı) konuldu. Reseptör kompartımanına 5 mL PBS çözeltisi konuldu.

0., 2., 4., 6., 8. ve 24. saatlerde reseptör kompartımanından 5 mL örnek alındı, yerine 5 mL taze tampon ortamı eklendi. Reseptör faza geçen peptit miktarı *LC-MS/MS* cihazı ile analiz edildi (Uchida et al., 2016).

Sonuçlar zamana karşı kümülatif akış grafiği ile gösterildi.

### **3.13. *In Vitro* Toksikolojik Testler**

*In vitro* toksisite testleri kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin güvenliği tolere edilebilirliğinin değerlendirilmesine yönelik önemli araçlardır. KLN lerin Raj (2012) belirttiği gibi toksikolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir.

#### **3.13.1 *In Vitro* 3T3 NRU fototoksisite testi**

Fototoksisite, cildin zararlı kimyasallara maruz kalmasıyla meydana gelen sistotoksik cevabın göstergesi olarak yorumlanmasdır (Kim et al.,2015).

3T3 NRU fototoksisite testi EU/COLIPA projesinde 1992-1997 arasında geliştirilmiş ve *in vivo* testlere alternatif olarak belirlenmiştir. (OECD Test Guidelines Programme,1996).

## **Yöntem**

Çalışmada ATCC firmasından temin edilen fare fibroblast hücre dizisi (3T3) kullanıldı. Hücre kültürü çalışmaları dizin 3.3 ve 3.3.1 de belirtilen şekilde yapıldı.

2 adet 96-kuyulu plakalara kuyu başına  $1 \times 10^4$  hücre ekildi. Peptit yüklü KLN için (test kimyasalı), (-UVA) ve (+UVA) olmak üzere iki plaka hazırlandı. Hücreler 24 saat boyunca etüvde inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra kuyucuklar 150  $\mu$ L PBS ile iki defa yıkandı. Uygun miktarda test kimyasalı veya sadece çözücü (negatif kontrol) içeren 100  $\mu$ L PBS ilave edildi. 8 farklı konsantrasyondaki test kimyasalı uygulandı. Hücreler test kimyasalıyla karanlıkta 60 dakika boyunca inkübe edildi. Yöntemin (+UVA) kısmını uygulamak için hücreler yapay güneş similatöründe oda sıcaklığında 50 dakika boyunca 1.7 mW/cm<sup>2</sup> UVA (= 5 J/cm<sup>2</sup>) ile 96-kuyucuklu plaka kapağından ışınıldı.

İkili plakalar (-UVA) oda sıcaklığında karanlık kutuda 50 dakika (= UVA maruziyet süresi) muhafaza edildi. Sonra, 150  $\mu$ L PBS ile yıkandı. Kültür ortamı ile bir gece inkübe edildi.

Hücreleri 150  $\mu$ L PBS'le yıkandı. 100  $\mu$ l NR (Nötr kırmızısı) koyuldu ve 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra NR uzaklaştırıldı, hücreler 150  $\mu$ L PBS ile yıkandı. 150  $\mu$ L NR desorb çözeltisi (taze hazırlanmış etanol/asetik asit) eklendi. Plakalar karıştırıcıda 10 dakika boyunca NR hücrelerden ekstrakte edilinceye ve homojen bir çözelti oluşuncaya kadar karıştırıldı. NR ekstraktının optik yoğunluğu spektrofotometrede 540 nm'de ölçüldü.

PIF (Foto İrritasyon Faktörü), test kimyasalının ışığın varlığında (+UV) ve yokluğunda (-UV) EC<sub>50</sub> (kullanılan kimyasalın en etkili olduğu konsantrasyonun yarısı) değeri photox version 2 programı ile bulundu.

PIF değeri, (-UV) EC<sub>50</sub> / (+UV) EC<sub>50</sub> formülü ile hesaplandı. PIF < 5 ise, test kimyasalının fototoksik olmadığı, PIF >5 ise fototoksik olarak değerlendirildi (OECD Test Guidelines Programme, 1996).

### 3.13.2 Bakteriye geri mutasyon ames testi

Dr. Bruce Ames tarafından 1972 yılında geliştirilmiş olan kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla tarama testi olarak uygulanan bir testtir (Mortelmans and Zeiger, 2000).

Test maddelerinin toksik, mutajenik-karsinojenik etkilerini incelemek için güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

Mutasyonla meydana getirilmiş *Salmonella typhimurium*'un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşlarının, sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (+S9) varlığında veya yokluğunda (-S9), test bileşeni uygulandıktan sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleyebilen ve histidinden bağımsız ortamda çoğalması esasına dayanmaktadır. Histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geri mutasyona uğrayan koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir (Zwarg et al., 2018).

#### Yöntem

EBPI firmasından temin edilen Amest ISO 384<sup>TM</sup> (384 Well Format) test kiti ile analizler yapıldı. Kit içeriğinde bulunan prensipler uygulandıktan sonra test kimyasalı 6 farklı konsantrasyon ile 2 gün boyunca 37 °C'de etüvde bekletildi. Her bir konsantrasyon için 48 kuyucuk kullanıldı.

*Salmonella typhimurium* TA100 (-S9) suşu kullanıldı. Negatif kontrol olarak Ultra saf su (NC), pozitif kontrol 4-Nitroquinoline 1-oxide (PC) kullanıldı.

PEP3 yüklü -KLN+ mannitol "test kimyasalı" olarak adlandırıldı. 80 µg/ml, 40 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml konsantrasyonlarda test kimyasalı kullanıldı.

Süre sonunda konsantrasyon başına 48 kuyucuk başına ≤15 den olması durumunda negatif [(mor-non revertant)], 48 kuyucuk başına ≥15 den olması durumunda pozitif [(sarı-revertant)] olarak değerlendirildi.

### 3.13.3 *In Vitro* EpiDerm™ deri korozyon testi

Kozmetiklerin deri irritasyonuna neden olması kozmetik üreticileri için önemli bir sorundur. Son yönetmeliklere göre bir kozmetik üreticisinin ürününü markete sürmeden önce güvenlik testlerini yapması zorunlu hale gelmiştir. Cilt korozyon testi, ciltte meydana gelen geri dönüşsüz hasarı saptayan testlerdir.

Deney hayvanlarının kozmetik ürün ve bileşenlerinin yasaklanmasının sonucu olarak alternatif test yöntemi olarak geliştirilmiştir (OECD,2004). EpiDerm, insandan üretilmiş epidermal keratinositlerin katmanlı bir modelidir (Liebsch et al., 2000)

EpiDerm™ Deri Korozyon Test kiti MatTek Corporation firmasından temin edilmiştir. Deneysel çalışmalar test kitinde belirtilen prosedürler çerçevesinde yapıldı.

EpiDerm™ testi, üç boyutlu insan epidermis (RhE) modeli üzerine uygulama ve hücre canlılığının metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) ile ölçülmesi esasına dayanan testtir. Deri modelinin test kimyasalı ile 3 dakika ve 60 dakika sonundaki maruziyeti ile meydana gelen sitotoksik cevaba göre koroziv (aşındırma) özelliği belirlendi. Negatif kontrol olarak, ultra saf su (NK), pozitif kontrol olarak, 8N KOH (PK) ve test kimyasalı olarak, PEP3 yüklü KLN + mannitol (25mg) kullanıldı.

Spektrofotometrik ölçüm sonrası yapılan canlılık hesabına göre değerlendirme yapıldı.

3 dakika test kimyasalı ile dokunun maruziyetin sonunda doku canlılığı % 50'nin altında ise test kimyasalının koroziv olduğu,

3 dakika test kimyasalı ile doku maruziyetinin sonunda doku canlılığı % 50'nin üzerinde fakat 60 dakika maruziyet ile % 15'in altında ise koroziv

3 dakika test kimyasalı ile maruziyetin sonunda doku canlılığı %50'nin üzerinde ve 60 dakika sonunda %15'in üzerinde is non-koroziv (aşındırıcı özelliği olmayan) şeklinde değerlendirildi.



### **3.14 In Vivo Etkinlik Testleri**

İn vivo etkinlik testleri Skin Lab INTERNATIONAL Ltd. firmasında gerçekleştirilmiştir. Testler; Avrupa Parlamentosu ve Konsey Tüzüğü (EC) Yönetmeliği, Kozmetik ürünlerle ilgili 30 Kasım 2009 tarih ve 1223/2009 sayılı, Kozmetik Avrupa - Kişisel Bakım Derneği (eski adı COLIPA) kuralları, İnsan Cildi Uyumluluğunun Değerlendirilmesine İlişkin Ürün Testi kuralları, Kozmetik Ürünlerin Etkinliğinin Değerlendirilmesine Yönelik Kılavuzlar'a (2008) göre yapıldı.

Çalışmaya katılan gönüllüler Polonya ve Avrupa Hukuku, COLIPA yönergeleri ve Helsinki Bildirgesi (1964) eklerine uygun olarak seçildi.

Ürünün uygulama testleri için kadınlar seçildi. Test için seçilen tüm gönüllüler onam formu imzalatıldı ve çalışmanın amacı, nasıl yapıldığı ve olası yan etkileri konusunda bilgilendirildi.

#### **3.14.1 Dermatolojik test (patch –yama testi)**

Yama testi, kozmetik ürün ve bileşenlerinin deri yüzeyinde meydana getirdiği etkiyi test etmek amacıyla uzman hekim nezaretinde sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılmaktadır.

Dervatyl adlı hammaddemizin alerjik olup olmadığını test etmek için 25 gönüllü üzerinde, yaşları 18 ile 62 arasında olan kişiler kullanıldı. F1 formülasyonu sırt bölgesinde 48 saat kalacak şekilde uygulandı. Uygulama tamamlandıktan 30 dakika sonra dermatolog tarafından değerlendirme yapıldı.

Test sonucunda cilt üzerinde tespit irritasyonun derecesine göre değerlendirme yapıldı. Az dan çoğa doğru 0 ile 5 arasında değer verildi.

#### **3.14.2 Cilt elastikiyet (esneklik) testi**

Cilt yaşlandıkça, kollajen ve elastin proteinleri azalır ve elastikiyetini kaybeder. Cilt elastikiyeti, gerilmeye ihtiyaç duyulduktan sonra cildin esneme ve

normal bir duruma dönme yeteneğidir. Elastikiyet derecesi, cildin tuttuğu kolajen ve elastin (iki doğal olarak oluşan protein) miktarı ile belirlenir. Yüksek elastikiyete sahip cilt dolgun, sıkı ve genç görünür.

F1 formülasyonu 10 gönüllü üzerinde 4 hafta günde 2 kez denendi. Cildin elastikiyeti ASW 300 ile polarize ışık (Aram Huvis, Korea) ile ölçümlendi. Ürün kullanımı öncesi ve sonrası değerlendirme yapıldı. İstatiksel analiz olarak Wilcoxon Signed Rank Testi yapıldı.

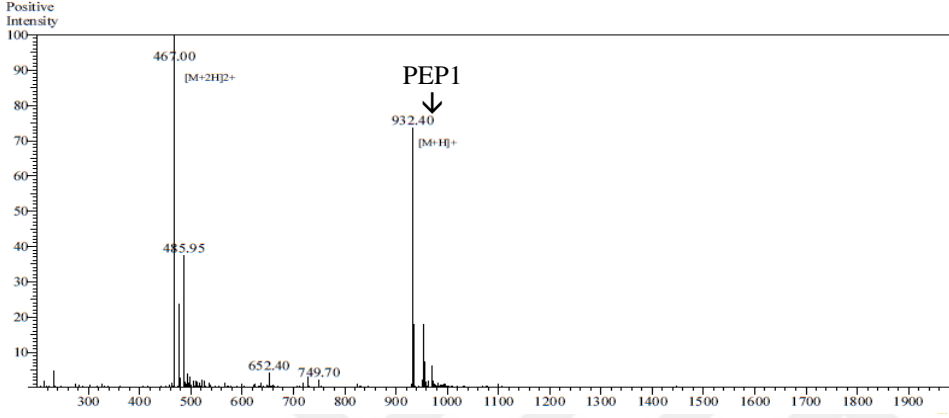
### **3.14.3 Cilt kırışıklık testi (anti wrinkle)**

F1 formülasyonu 10 gönüllü üzerinde 4 hafta günde 2 kez denendi. Cilt kırışıklık oranı ASW 300 ile polarize ışık (Aram Huvis, Korea) ile ölçümlendi. Ürün kullanımı öncesi ve sonrası değerlendirme yapıldı. İstatiksel analiz olarak Wilcoxon Signed Rank testi uygulandı.

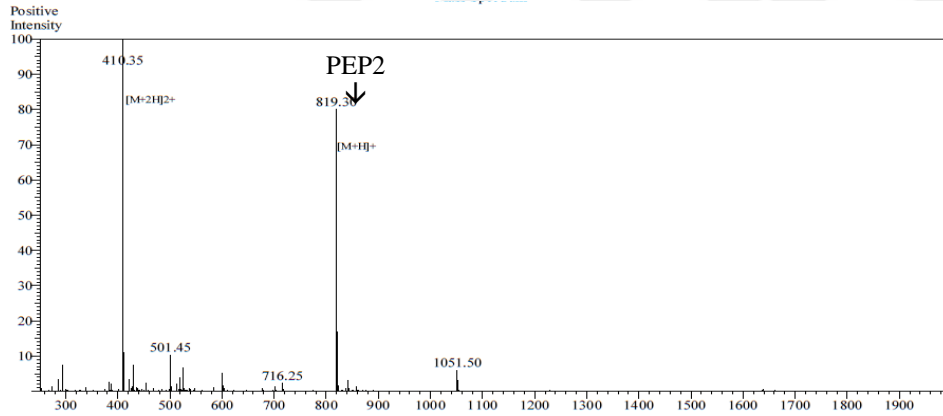
## 4. SONUÇLAR

### 4.1 PEP1, PEP2 ve PEP3'ün HPLC Kromatogram Görüntüleri

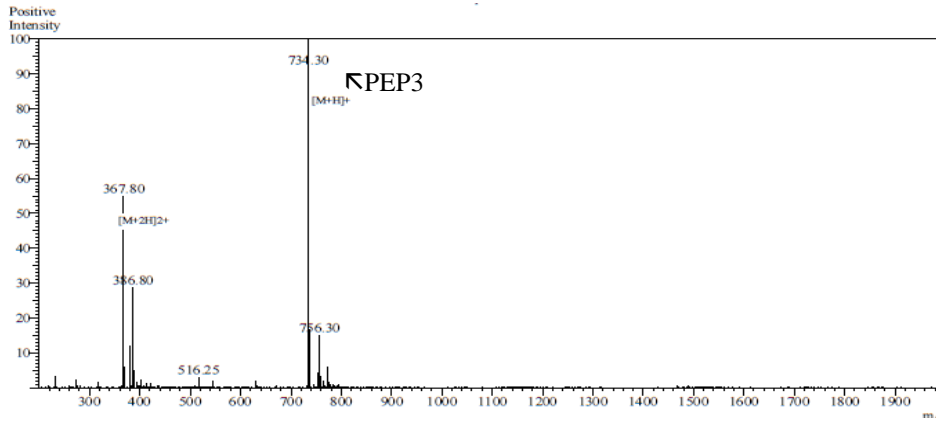
Tez kapsamında, tasarlanan peptitlerin (PEP1, PEP2 ve PEP3) HPLC kromatogramları sırasıyla aşağıda (Şekil 4.1, 4.2, 4.3) verilmiştir.



Şekil 4.1 PEP1 HPLC kromatogram görüntüsü



Şekil 4.2 PEP2 HPLC kromatogram görüntüsü



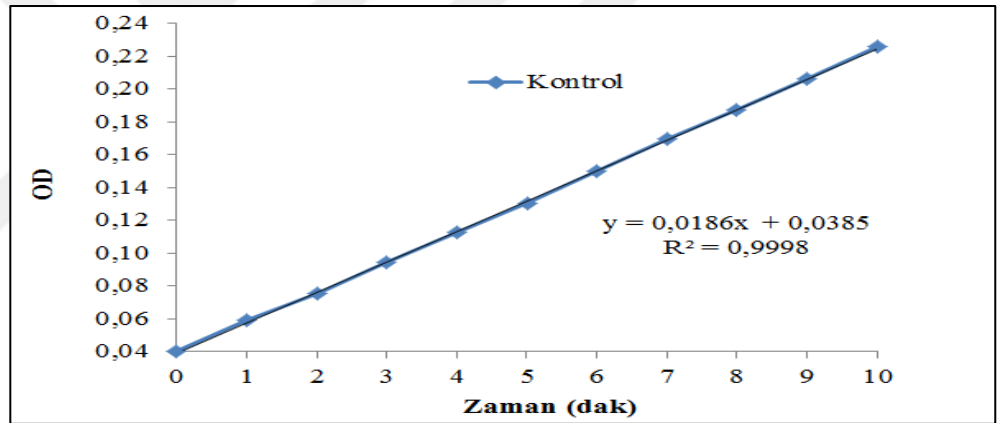
Şekil 4.3 PEP3 HPLC kromatogram görüntüsü

## 4.2 İnhibitör Tarama Testi ile PEP1, PEP2 ve PEP3'ün İnhibitör Etkisinin Ölçülmesi.

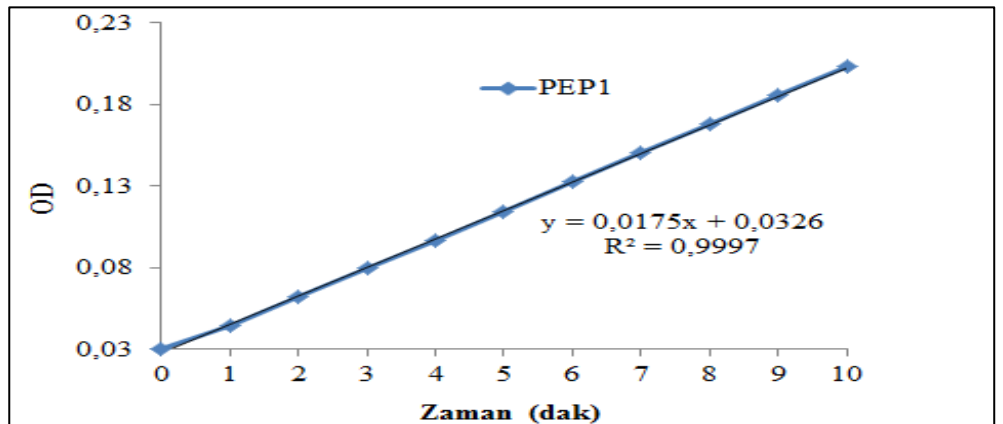
MMP-12 enzimine özel olarak tasarlanmış olan PEP1, PEP2 ve PEP3 oligopeptitlerinin inhibisyonu kinetik olarak ölçüldü. 10 dakika boyunca alınan ölçümlerden sonra oluşturulan doğrunun eğiminden bölüm 3. 2'de anlatıldığı gibi % inhibisyon değeri olarak hesaplandı.

### 4.2.1 6,5 $\mu$ M düzeyindeki inhibitör konsantrasyonun belirlenebilmesi için doğru eğiminin hesaplanması

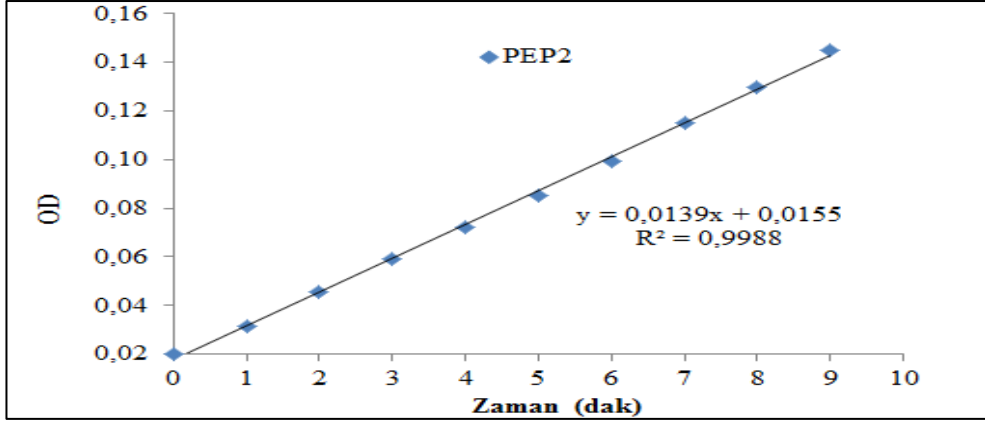
PEP1'in % 5,91, PEP2'nin %25,26 ve PEP3'ün % 22,58 oranında inhibisyon yaptığı belirlendi (Şekil 4.5, 4.6, 4.7).



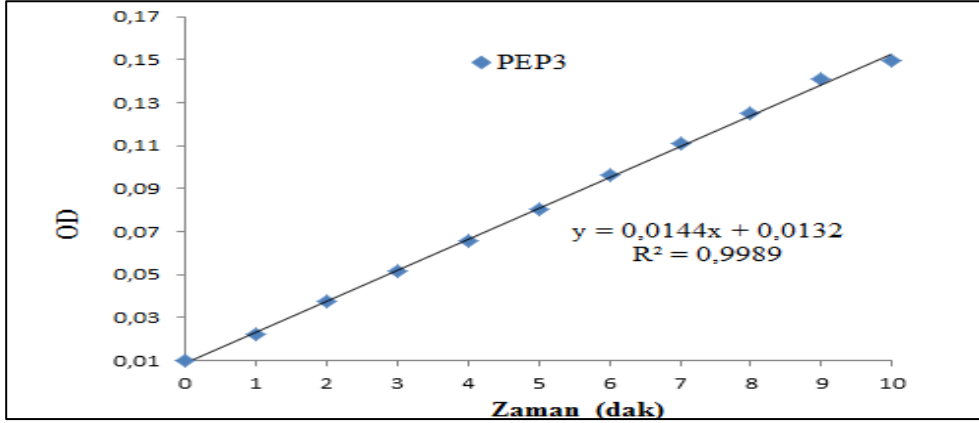
Şekil 4.4 Kontrolün zamana karşı doğru eğimi grafiği. OD (Optik yoğunluk).



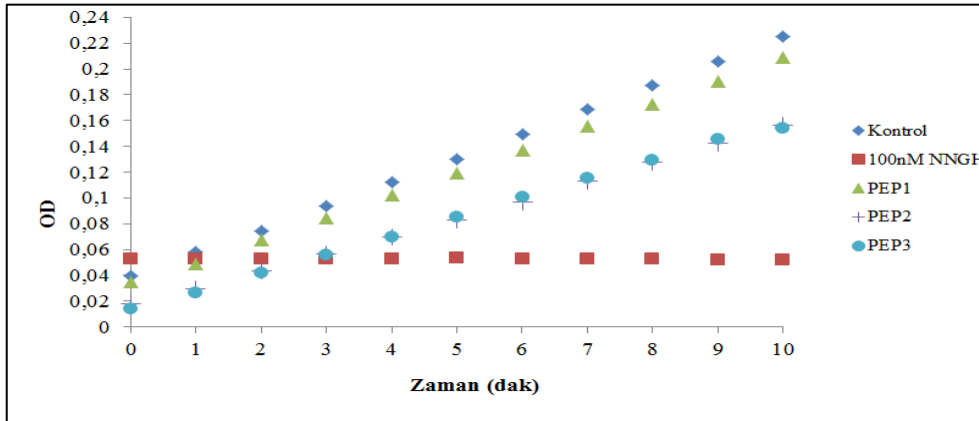
Şekil 4.5 PEP1'in zamana karşı doğru eğimi grafiği OD (Optik yoğunluk).



Şekil 4.6 PEP2'nin zamana karşı doğru eğimi grafiği OD (Optik yoğunluk).



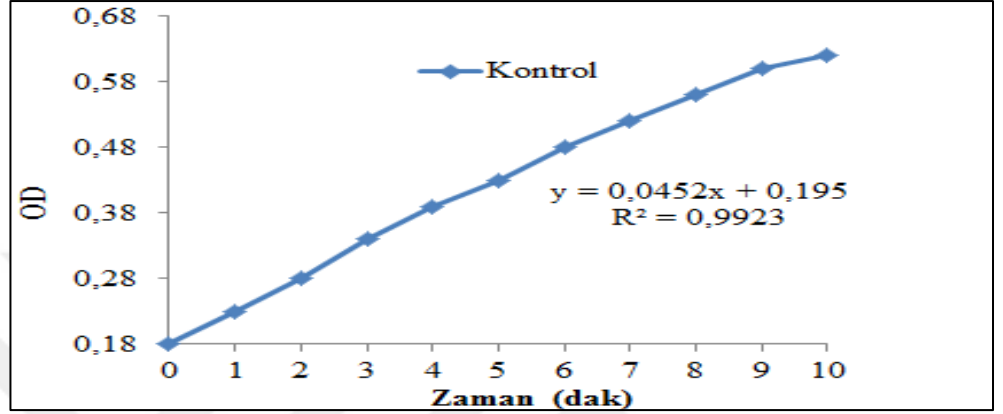
Şekil 4.7 PEP3'ün zaman karşı doğru eğimi grafiği OD (Optik yoğunluk).



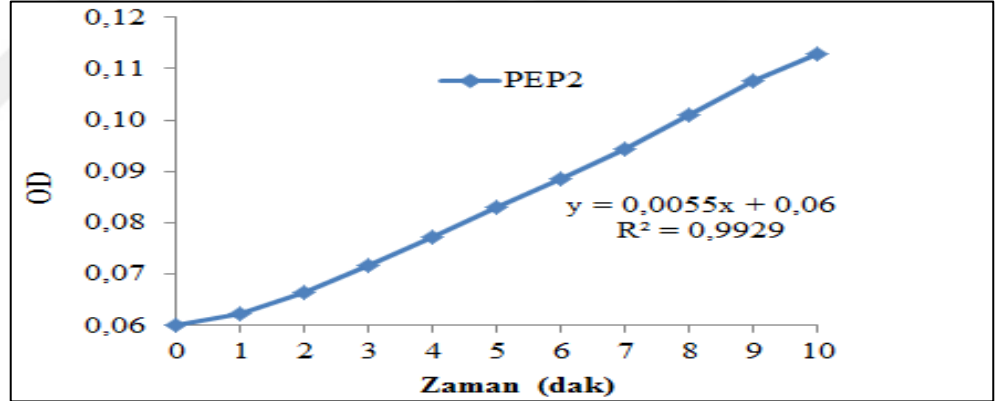
Şekil 4.8 PEP1, PEP2, PEP3 ve NNHGH'nin MMP-12 inhibisyonu üzerine etkisinin zamana karşı gösterilmesi. OD (Optik yoğunluk).

#### 4.2.2 13 $\mu\text{M}$ düzeyindeki inhibitör konsantrasyonunun belirlenebilmesi için doğru eğiminin hesaplanması

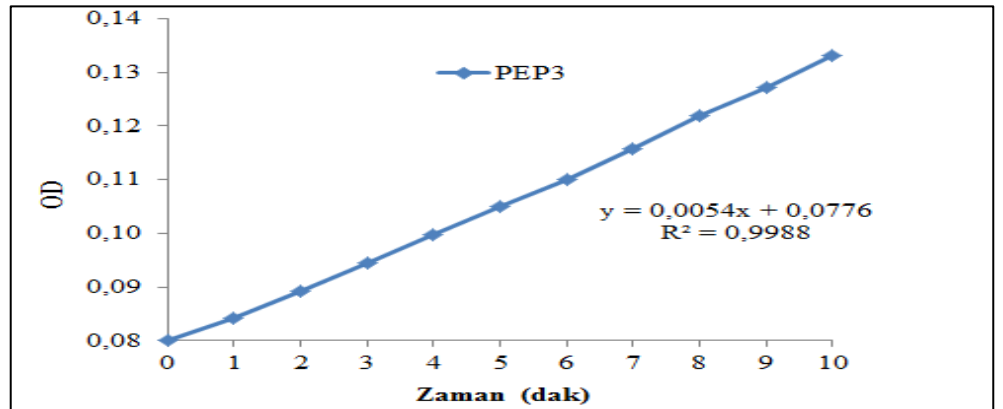
Şekil 4.10 ve 4.11 de gösterilen grafikler yardımıyla, % Enzim inhibisyonu formülü kullanılarak, PEP2'nin %87,83 ve PEP3'ün % 88,05 oranında inhibisyon yaptığı belirlendi.



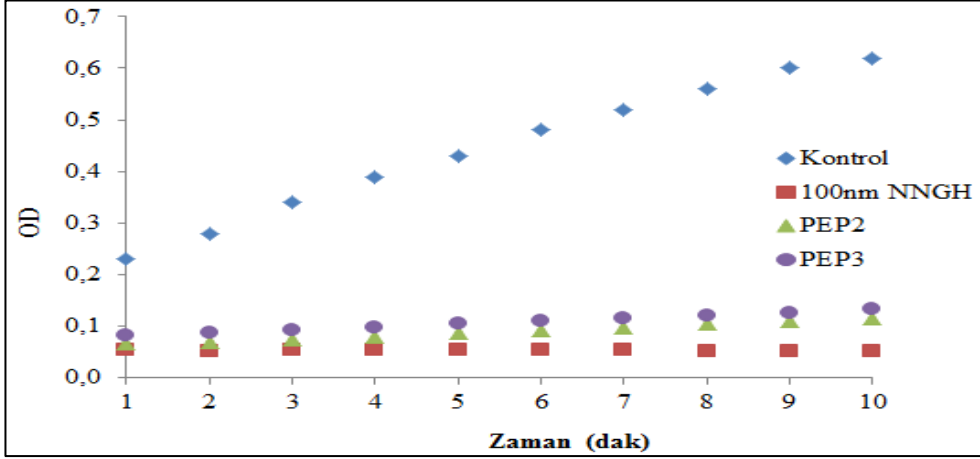
Şekil 4.9 Kontrol grubunun zamana karşı doğru eğimi grafiği. OD (Optik yoğunluk).



Şekil 4.10 PEP2'nin zamana karşı doğru eğimi grafiği. OD (Optik yoğunluk).



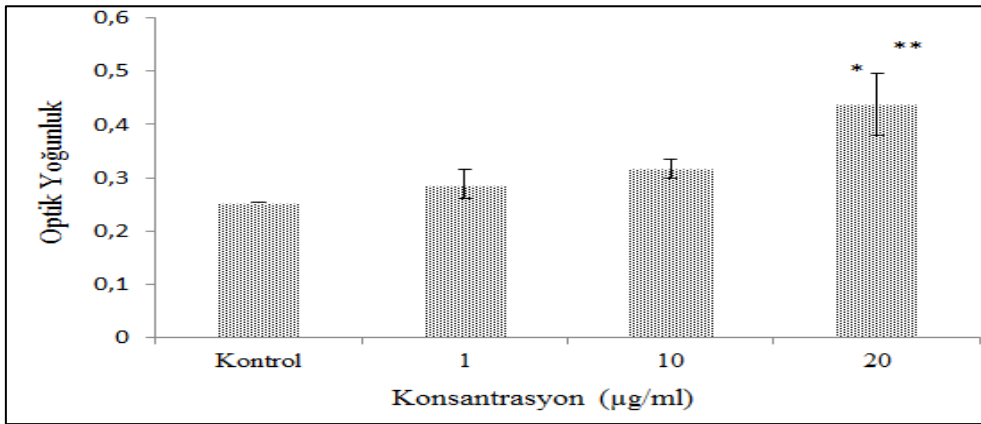
Şekil 4.11 PEP3'ün zamana karşı doğru eğimi grafiği. OD (Optik yoğunluk).



Şekil 4.12 PEP1, PEP2, PEP3 ve NNHGH'nin MMP-12 inhibisyonu üzerine etkisinin zamana karşı gösterilmesi. OD (Optik yoğunluk).

### 4.3 Farklı Konsantrasyonlardaki PEP3'ün, HS68 Hücrelerine Olan Proliferatif Etkisinin Belirlenmesi.

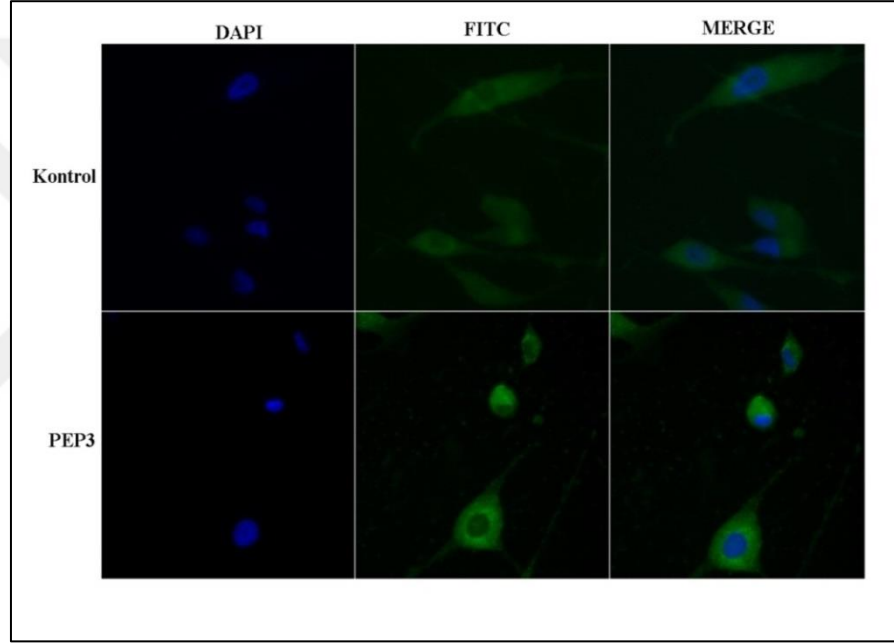
72 saat süresinde PEP3 ile muamele edilen HS68 hücrelerinde, 20 µg/ml konsantrasyonda kontrolüne göre proliferatif etkide istatistiksel artış gözlemlendi (Şekil 4.13), ( $p < 0,05$ ). 10 µg/ml ve 20 µg/ml konsantrasyonlar karşılaştırıldığı zaman, proliferatif etkinin, 20 µg/ml de anlamlı derecede arttığı bulundu. ( $p < 0,01$ ).



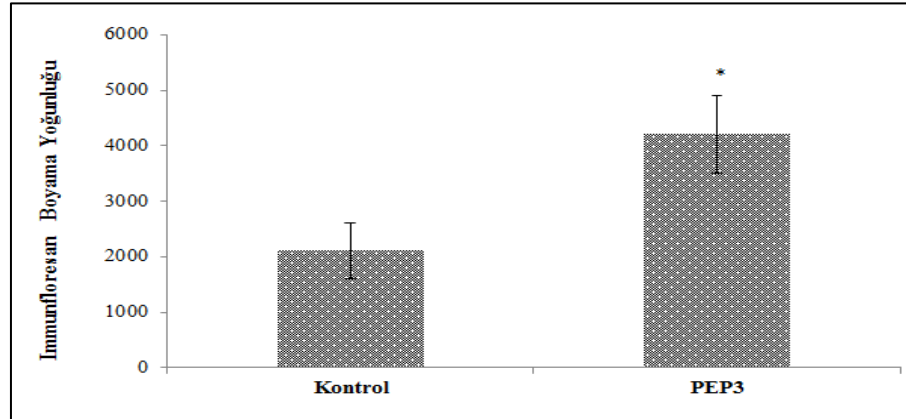
Şekil 4.13 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün, 72. saat sonunda HS68 hücrelerine olan proliferatif etkisinin dağılımı. \* ( $p < 0,05$ ), kontrol grubuna göre anlamlı; \*\* ( $p < 0,01$ ), 10 µg/ml konsantrasyona göre anlamlı.

#### 4.4 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin'nin Immunofloresan Analizinin Değerlendirilmesi

20 µg/ml konsantrasyonda PEP3 uygulanan HS68 hücrelerinin 48 saat süresi sonunda vermiş olduğu ışımaya görüntüleri floresan mikroskobu ile 40x büyütme de alındı. Imaje J programı ile görüntüler analiz edilerek floresan boyama yoğunluğu grafiği ile gösterildi. Kollajen I proteinine ait kontrol ve PEP3 floresan yoğunluğu karşılaştırıldığı zaman PEP3 grubunda kontrole göre anlamlı bir artış meydana geldi ( $p<0,05$ ). PEP3 grubundaki floresan boyama yoğunluğunun kontrol grubuna göre 1,99 kat artış gözlemlendiği hesaplandı (Şekil 4.14, 4.15).



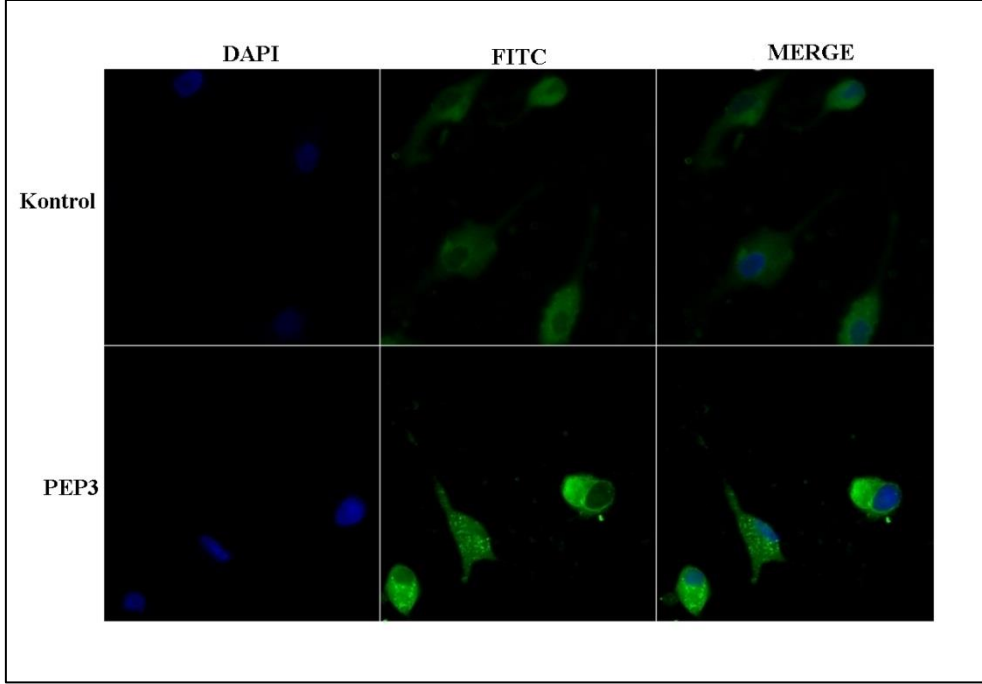
Şekil 4.14 Kollajen I proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskobik görüntüleri.



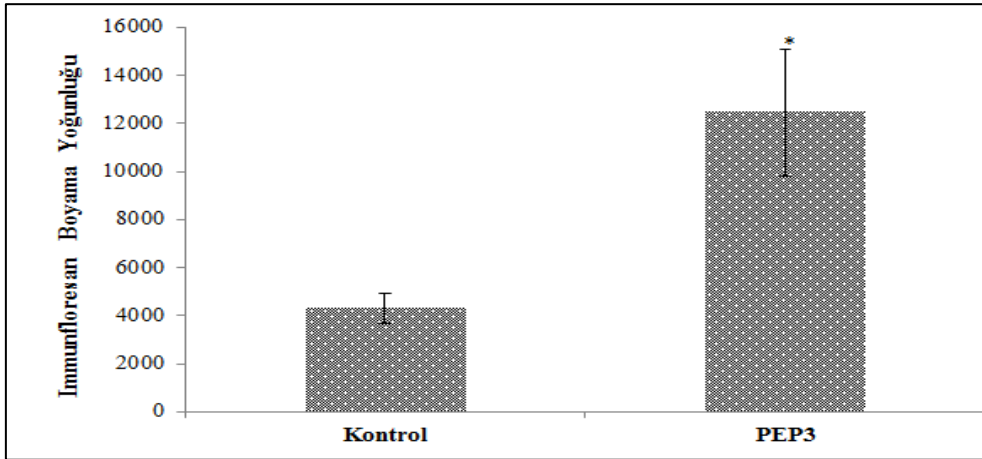
Şekil 4.15 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, kollajen I proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması,  $*p<0,05$  kontrol grubuna göre anlamlı.



Kollajen IV proteinine ait kontrol ve PEP3 floresan yoğunluğu karşılaştırıldığı zaman PEP3 grubundan kontrole göre anlamlı bir artış meydana geldi ( $p<0,05$ ). PEP3 grubunda ki floresan boyama yoğunluğunun kontrol grubuna göre 2,88 kat artış gözlemlendiği hesaplandı (Şekil 4.16, 4.17).



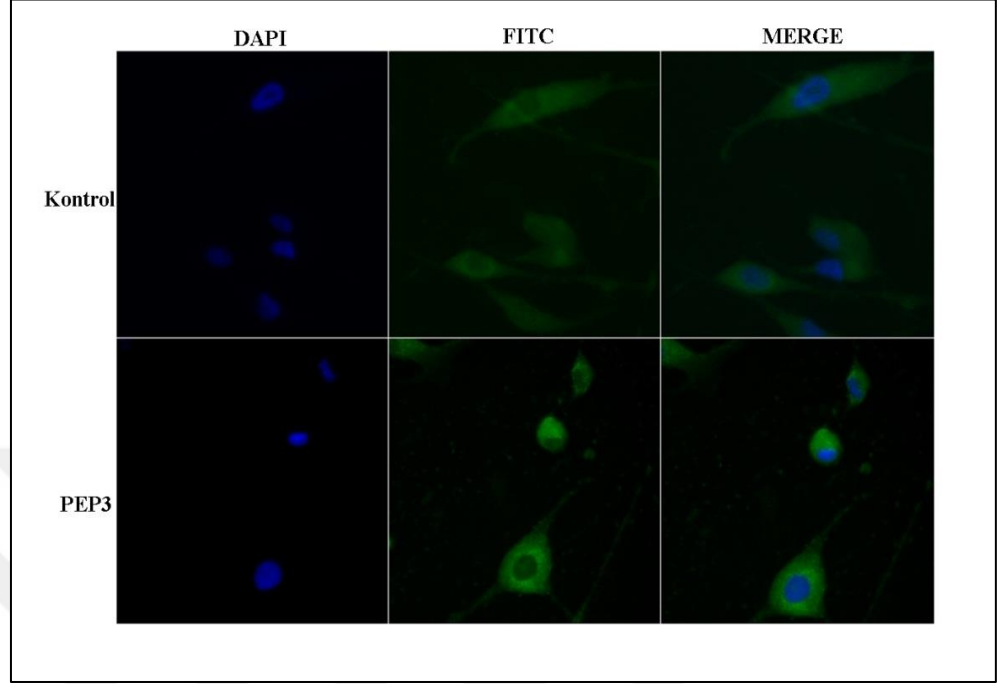
Şekil 4.16 Kollajen IV proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskopik görüntüleri.



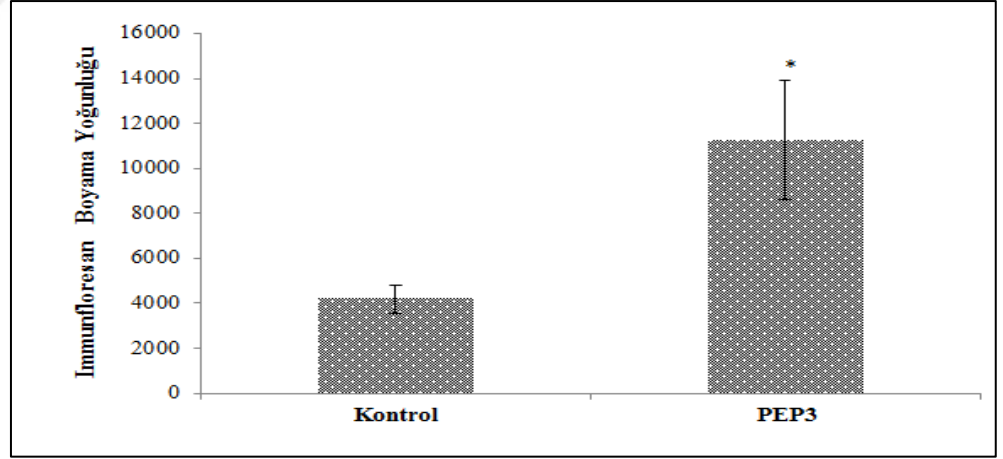
Şekil 4.17 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, kollajen IV proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması, \* $p<0,05$  kontrol grubuna göre anlamlı.

Elastin proteinine ait kontrol ve PEP3 floresan yoğunluğu karşılaştırıldığı zaman PEP3 grubundan kontrole göre anlamlı bir artış meydana geldiği gözlemlendi

( $p < 0,05$ ). PEP3 grubunda ki floresan boyama yoğunluğunun kontrol grubuna göre 2,67 kat artış hesaplandı (Şekil 4.18,4.19).

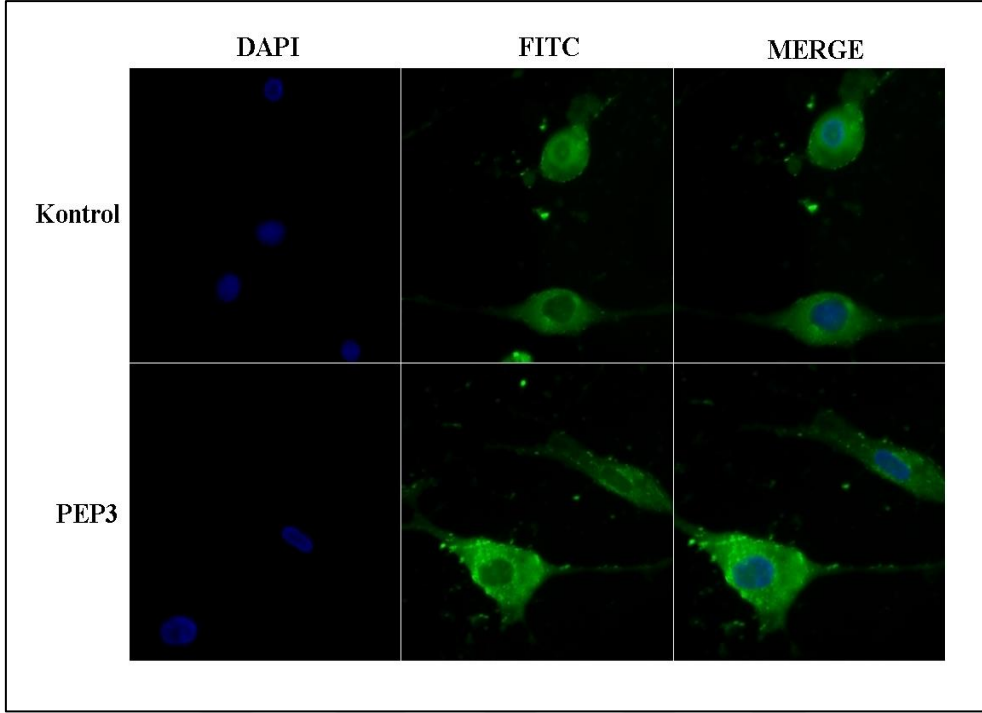


Şekil 4.18 Elastin proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskobik görüntüleri.

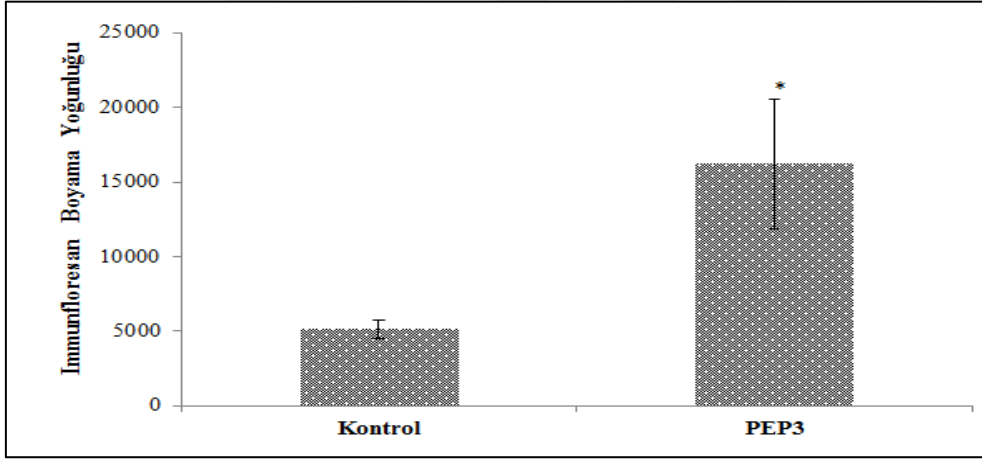


Şekil 4.19 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, elastin proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması, \* $p < 0,05$  kontrol grubuna göre anlamlı.

Fibronektin proteinine ait kontrol ve PEP3 floresan yoğunluğu karşılaştırıldığı zaman PEP3 grubundan kontrole göre anlamlı bir artış meydana geldi ( $p < 0,05$ ). PEP3 grubunda ki floresan boyama yoğunluğunun kontrol grubuna göre 3,18 kat artış gözlemlendiği hesaplandı (şekil 4.20,4.21).



Şekil 4.20 Fibronektin proteinin yaymış olduğu floresan yoğunluğunun mikroskopik görüntüleri.

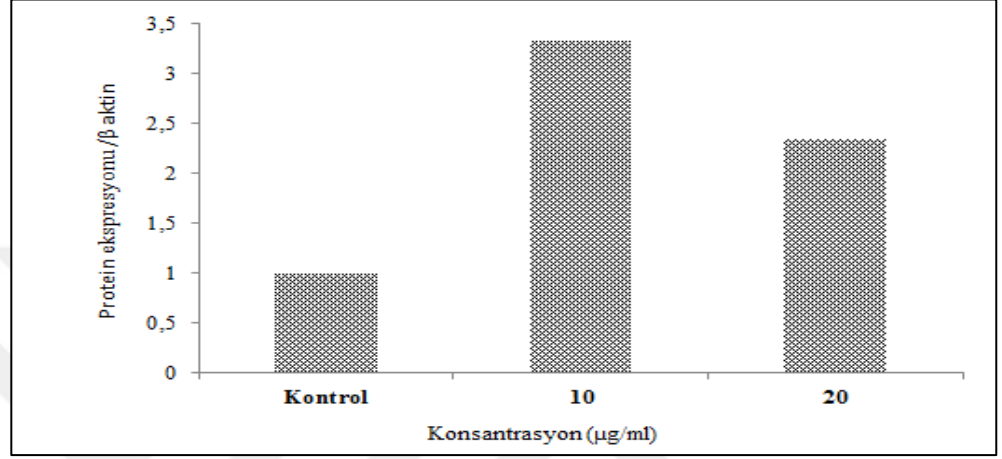


Şekil 4.21 İmmun floresan boyama yoğunluğu hesabının, fibronektin proteini için kontrol ve PEP3 grubunda istatistiksel olarak karşılaştırılması, \* $p < 0,05$  kontrol grubuna göre anlamlı.

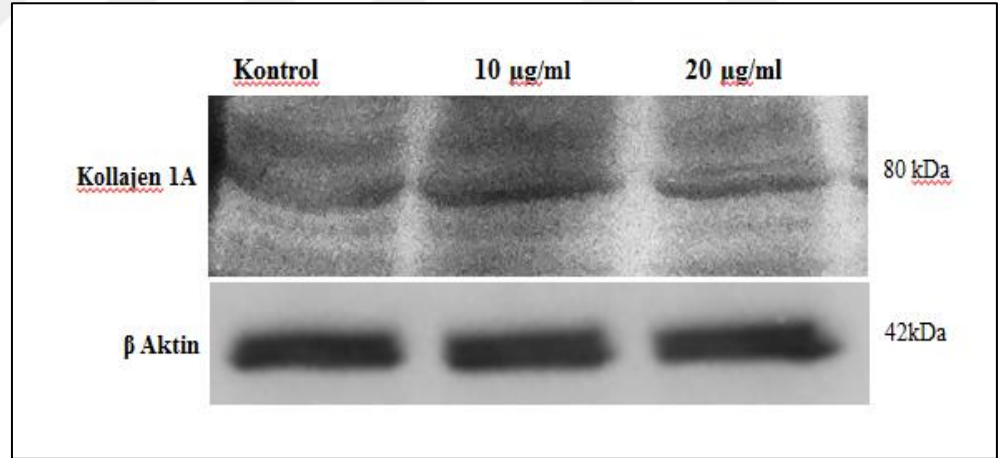
#### 4.5 Kollajen I, IV, Elastin ve Fibronektin Proteinlerinin Ekspresyonlarının Western Blot Tekniği İle Değerlendirilmesi

10  $\mu\text{g/ml}$  ve 20  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyon PEP3 uygulanan HS68 hücrelerinin 48 saat süresi sonunda protein ekspresyon miktarları Western blot yöntemi ile analiz edildi. İmaje J programı ile bantların dansitometresi yarı kantitatif olarak analiz

edildi. Protein ekspresyonu/ $\beta$  aktin-konsantrasyon grafiği ile protein miktarlarındaki dağılım gösterildi. Kollajen I proteinine ait kontrol ve konsantrasyonlar birbirleriyle karşılaştırıldığı zaman, kontrole göre en fazla artışın 10 $\mu$ g/ml de olduğu bulundu. 10  $\mu$ g/ml de kontrole göre 3,33 kat protein miktarında artış, 20  $\mu$ g/ml de kontrole göre 2,34 kat protein miktarında artış gözlendi (şekil 4.23).

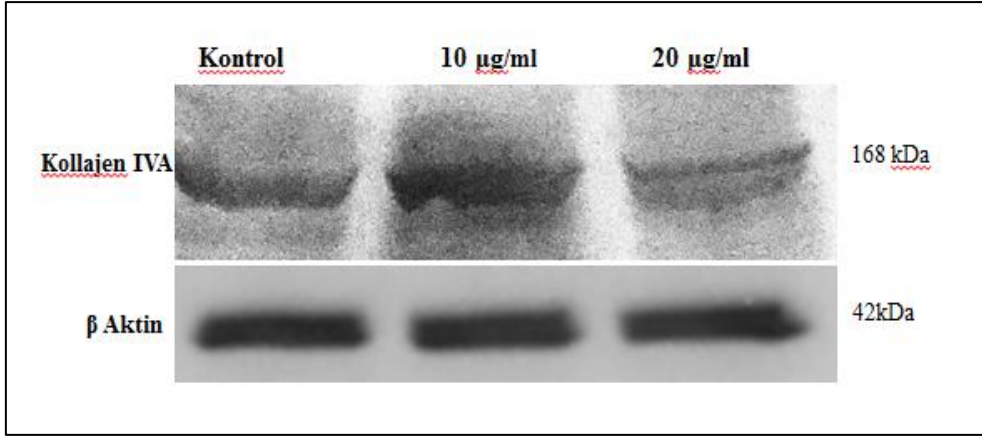


şekil 4.22 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'n kollajen I protein bantlarının görüntüsü.

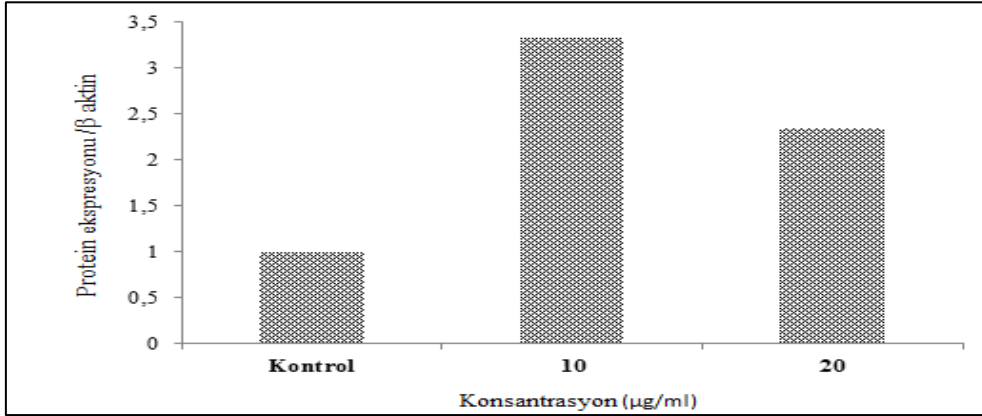


şekil 4.23 PEP3 konsantrasyonlarının kollajen I proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi

Kollajen IV proteinine ait kontrol ve konsantrasyonlar birbirleriyle karşılaştırıldığı zaman, kontrole göre en fazla artışın 10 $\mu$ g/ml de olduğu bulundu. 10  $\mu$ g/ml de kontrole göre 3,88 kat protein miktarında artış, 20  $\mu$ g/ml de kontrole göre 2,43 kat protein miktarında artış gözlendi (şekil 4.25).

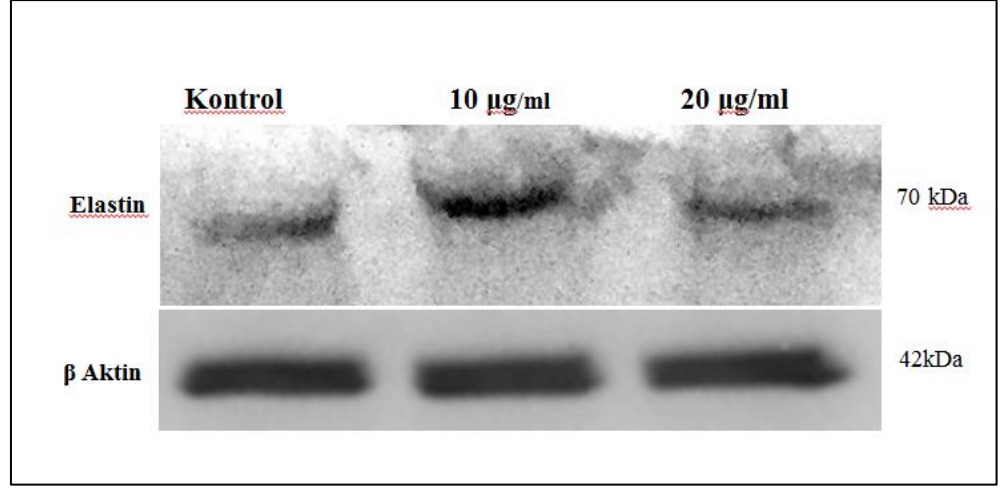


Şekil 4.24 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün kollajen IV protein bantlarının görüntüsü.

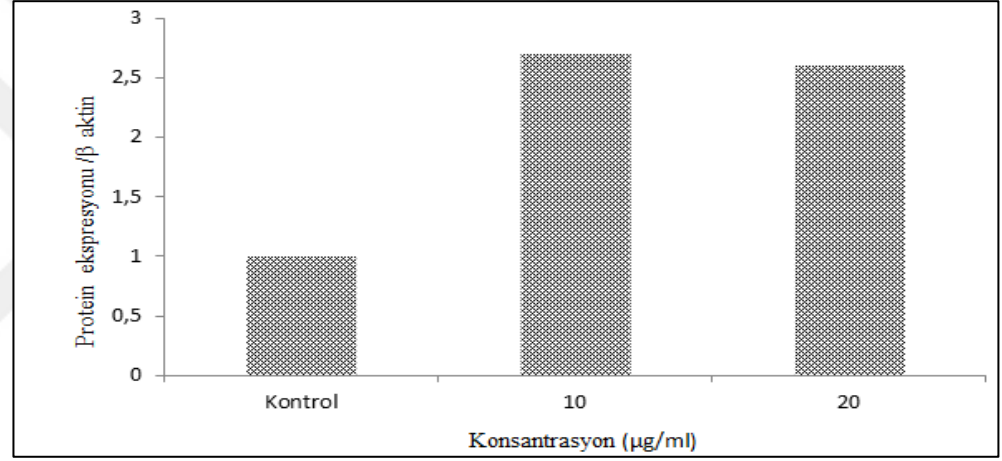


Şekil 4.25 PEP3 konsantrasyonlarının kollajen IV proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi.

Elastin proteinine ait kontrol ve konsantrasyonlar birbirleriyle karşılaştırıldığı zaman, kontrole göre en fazla artışın 10 $\mu$ g/ml de olduğu bulundu. 10  $\mu$ g/ml de kontrole göre 2,7 kat protein miktarında artış, 20  $\mu$ g/ml de kontrole göre 2,6 kat protein miktarında artış gözlemlendi (Şekil 4.27).

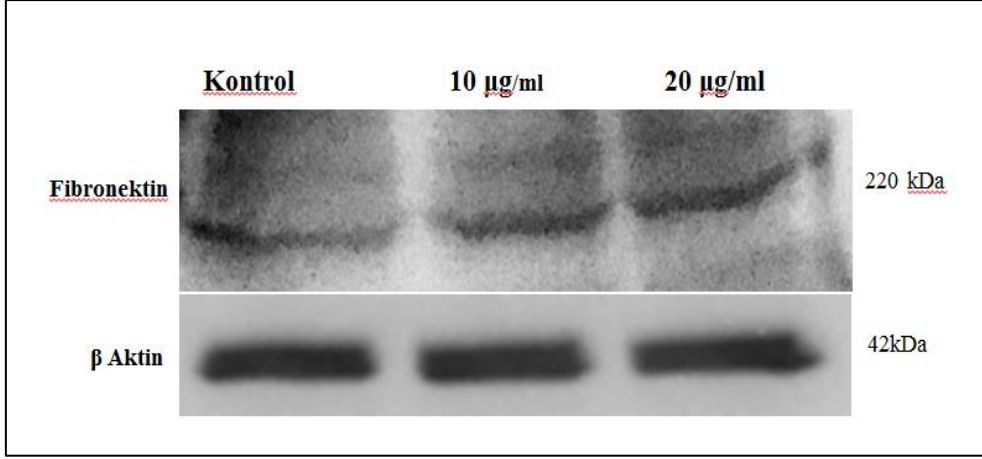


Şekil 4.26 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün elastin proteini bantlarının görüntüsü

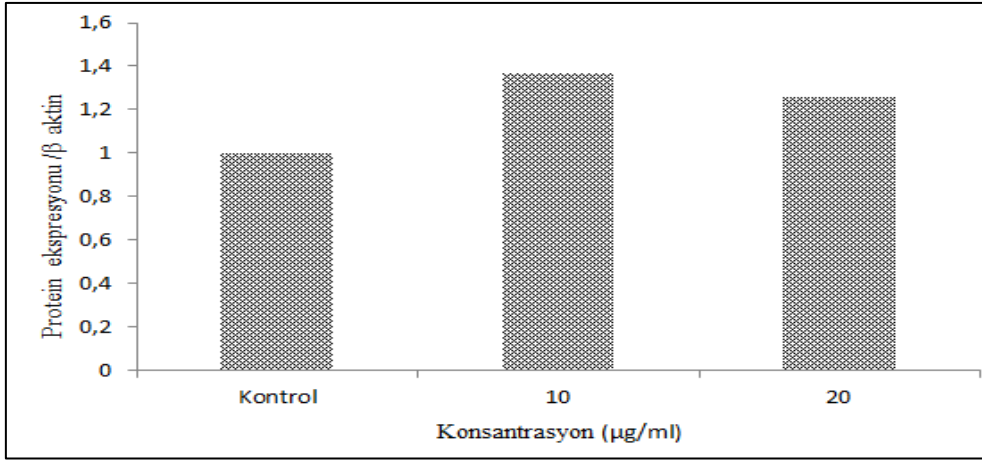


Şekil 4.27 PEP3 konsantrasyonlarının elastin proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi.

Fibronektin proteinine ait kontrol ve konsantrasyonlar birbirleriyle karşılaştırıldığı zaman, kontrole göre en fazla artışın 10 $\mu\text{g/ml}$  de olduğu bulundu. 10  $\mu\text{g/ml}$  de kontrole göre 1,37 kat protein miktarında artış, 20  $\mu\text{g/ml}$  de kontrole göre 1,26 kat protein miktarında artış gözlemlendi (Şekil 4.29).



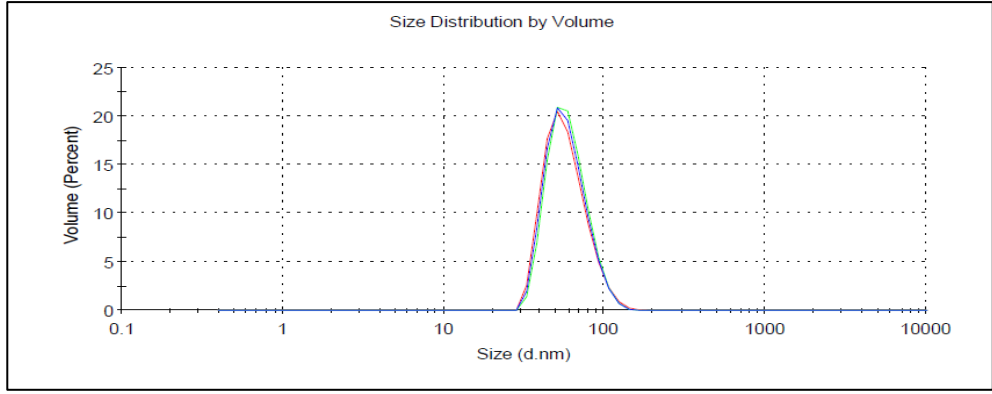
Şekil 4.28 Farklı konsantrasyonlardaki PEP3'ün fibronektin proteini bantlarının görüntüsü.



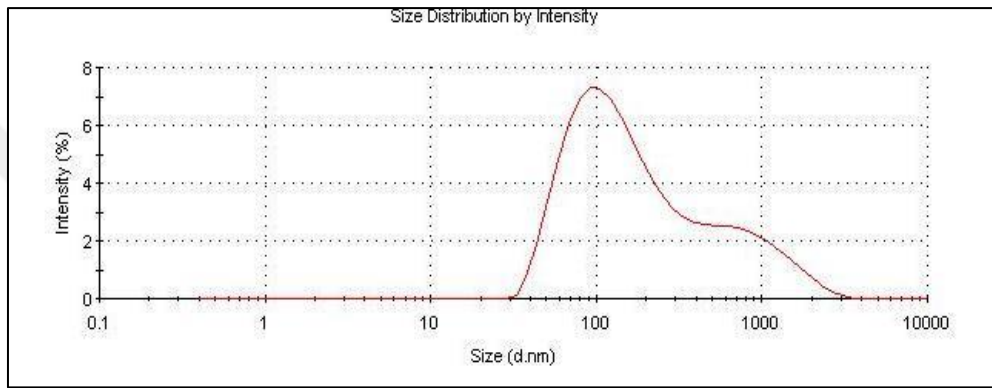
Şekil 4.29 PEP3 konsantrasyonlarının fibronektin proteini ekspresyonlarının kontrol grubuna göre gösterilmesi.

#### 4.6 KLN Formülasyonun Değerlendirilmesi

PEP3 yüklü KLN hazırlığı bölüm 3.9 ve 3.9.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Çizelge 3.3'e gösterildiği gibi hazırlanan KLN ler mikrofluidik sistem ile oluşturuldu.



Şekil 4.30 Boş KLN'ye ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği.



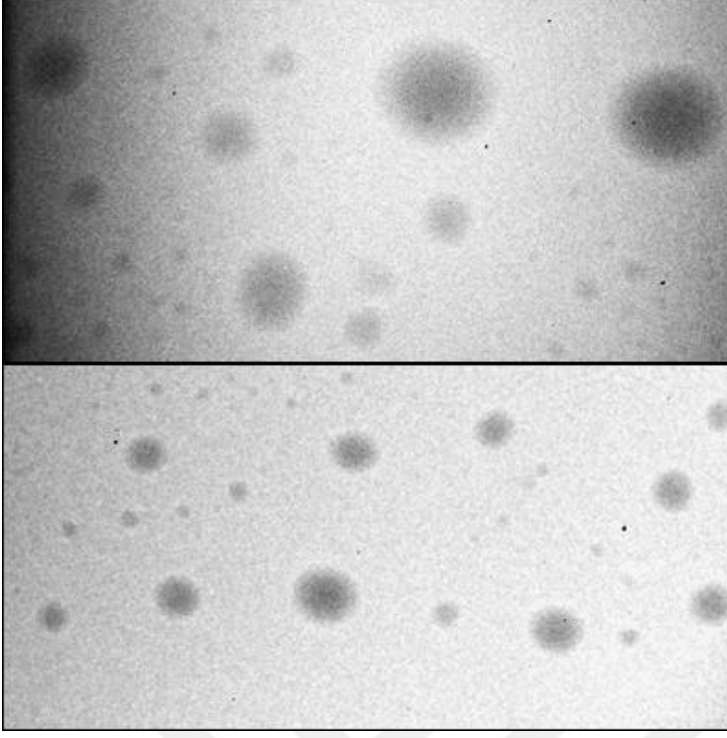
Şekil 4.31 PEP3 yüklü KLN'ye ait partikül büyüklüğü dağılım grafiği.

Çizelge 4.1 KLN formülasyonunun ölçülen partikül büyüklüğü ve PDI değerleri ( ortalama± standart sapma değeri).

	Ölçüm sırasında seyreltme oranı	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI
Boş partikül	-	65,90 ±0,49	0,064±0,016
PEP3 yüklü KLN	-	128,02 ± 3,87	0,388±0,023

Şekil 4.32'de görüldüğü gibi PEP3 yüklü KLN yapısının TEM analizi yapıldı. Nanopartiküllerin küresel ve homojen bir görünüm sergilediği gösterildi.





Şekil 4.32 PEP3 yüklü KLN TEM mikroskobu görüntüsü.

#### **4.7 Kriyoprotektanlar ile Liyofilizasyon İşleminin KLN Üzerine Etkisi**

KLN'nin uzun süreli fiziksel ve kimyasal stabilitesini artırmak için çeşitli kriyoprotektanlar ile farklı konsantrasyonlarda liyofilizasyon işlemi yapılmıştır. Kriyoprotektan olarak nanopartikül yapısına uygun olabilecek olan fruktoz, sukroz ve mannitol şekerleri kullanılmıştır. Liyofilize edilen KLN ler 1/100 oranında ultra saf su ile redisperse edilerek partikül büyüklüğü ve PDI değerleri ölçüldü.

Büyüme oranı ise liyofilize KLN'nin partikül büyüklüğünün başlangıç KLN partikül büyüklüğüne bölünmesi ile hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre en az büyüme oranına %10'luk (W/v) mannitol ile kurutulan nanopartiküllerin sahip olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2)

**Çizelge 4.2** Farklı konsantrasyonlardaki kriyoprotektanlar ile liyofilize KLN lerin redisperse edilmesi ile ölçülen partikül büyüklüğü ve PDI değerleri (ortalama± standart sapma değeri).

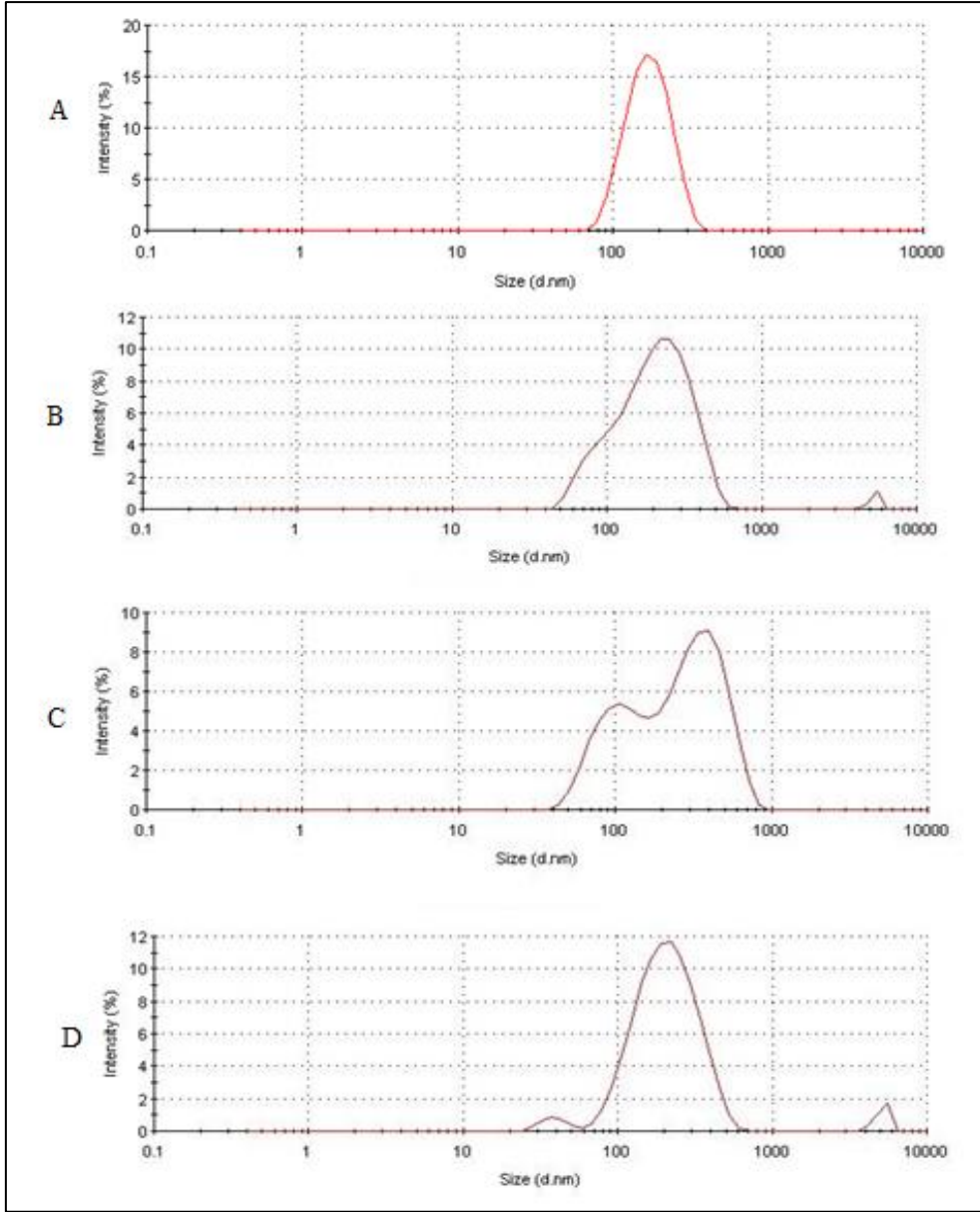
	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Büyüme oranı
Boş KLN	65,90±0,49	0,064±0,016	
Başlangıç ( peptid yüklü) KLN	128,02±3,87	0,388±0,023	
Kriyoprotektan kullanılmamış PEP3 yüklü KLN	274,45±11,80	0,50±0,002	2,14
Fruktoz % 5 (w/v)	131,56± 0,11	0,144±0,006	1,02
Fruktoz % 10 (w/v)	146,83±7,61	0,174±0,043	1,14
Mannitol %5 (w/v)	122,2±0,50	0,252±0,007	0,96
Mannitol %10 (w/v)	120,93±12,30	0,237±0,032	0,94
Sukroz % 5 (w/v)	196,36±15,10	0,243±0,014	1,53
Sukroz % 10 (w/v)	148,60±2,09	0,139±0,019	1,16

#### 4.8 %10 luk Mannitol İle Liyofilize Edilen PEP3 Yüklü KLN'nin Stabilizasyonunun Değerlendirilmesi

% 10 luk mannitol ile kurutulan PEP3 yüklü KLN'nin stabilite çalışması için,  $4 \pm 2$  °C/60 ± 5% nem,  $25 \pm 2$  °C/60 ± 5% nem ve  $40 \pm 2$ °C/75 ± 5 nem koşullarında stabilite çalışmaları yapıldı. 0. ay, 3. ay ve 6.ayın sonunda partikül büyüklüğü ve PDI değerleri (Şekil 4.33), 9.ayın sonunda KLN den ortama salınan peptit düzeyi bölüm 3.9' da anlatıldığı şekilde yapıldı.

**Çizelge 4.3** PEP3 yüklü KLN lerin zamana göre farklı sıcaklıklardaki redisperse edilmesi ile ölçülen partikül büyüklüğü ve PDI değerleri (ortalama± standart sapma değeri), nd\*(değerlendirme yapılamadı), öd ( ölçüm alınmadı).

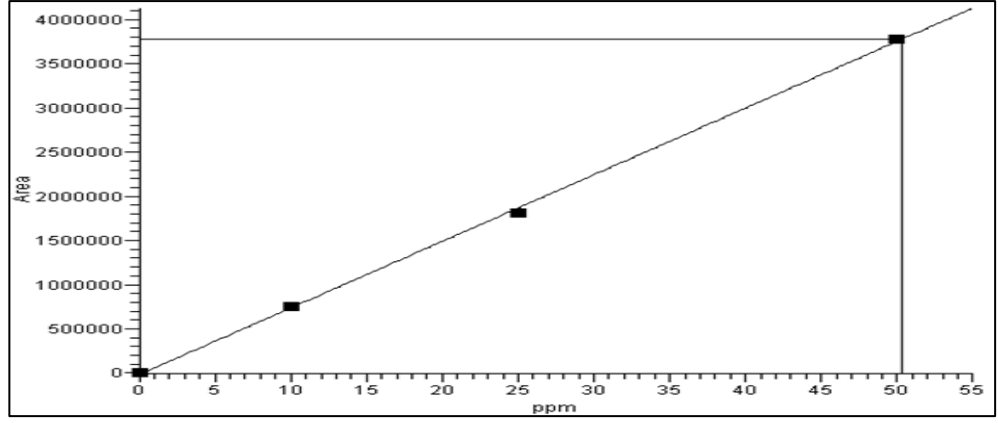
Aylar	Sıcaklık	Partikül büyüklüğü (nm)	PDI	Ortama salınan PEP3 düzeyi (ppm)
0.	4 °C	128,02±3,87	0,50±0,02	0
3.	4 °C	188,33±3,194	0,317±0,045	ö.d
	25 °C	249±8,54	0,419±0,03	ö.d
	40 °C	1184±15,06	0,70±0,01	ö.d
9.	4 °C	190,60±6,26	0,328±0,02	0,8
	25 °C	266,01±7,82	0,547±0,03	1,4
	40 °C	n.d*		



Şekil 4.33 PEP3 yüklü KLN'ye ait farklı zaman ve koşullardaki partikül büyüklüğü dağılımı grafiği. A (3. Ay 4 oC), B (3. Ay 25 oC), C (6. Ay 4 oC), D (6. Ay 25 oC).

#### 4.9 PEP3 Yüklü KLN'lerin Enkapsülasyon Veriminin Ölçülmesi

Şekil 4.34'de görüldüğü gibi LC/MS-MS ile standart grafiği çizildi. En kapsülasyon verimi ölçümü bölüm 3.10'da anlatıldığı şekilde yapıldı ve verim % 59,92 olarak bulundu (Çizelge 4.4).



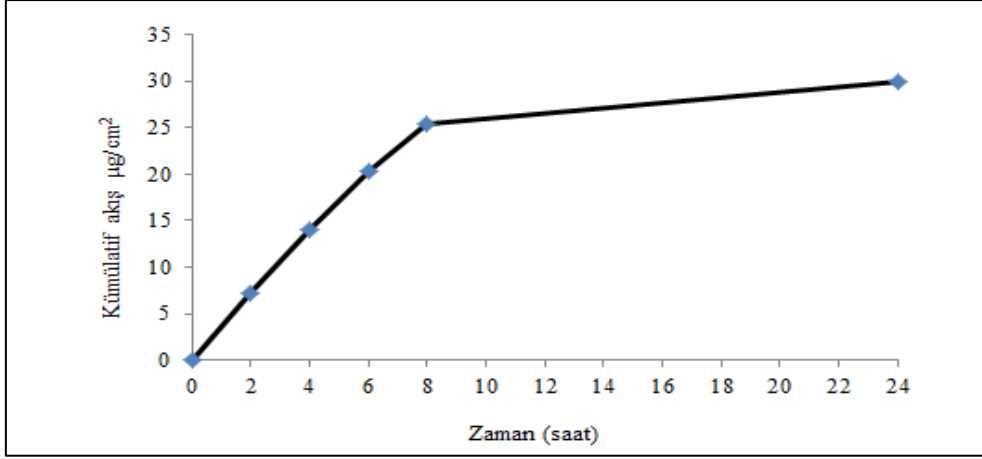
Şekil 4.34 LC-MS/MS ile PEP3 standart grafiğinin çizilmesi.

Çizelge 4.4 Enkapsülasyon verimi hesabı

Başlangıçta toplam etken madde miktarı (ppm)	Yüklenmemiş etken madde miktarı (ppm)	% EE
50	20,039	59,92

#### 4.10 *In Vitro* Transdermal Difüzyon Çalışmasının Değerlendirilmesi

*In vitro* difüzyon çalışmaları ve *in vivo* testler için “Hücre Bazlı Cilt Yapılandırma Serumı” adı verilen formülasyon içeriğinde bulunan PEP3 yüklü KLN’nin trans dermal salınımı için difüzyon çalışması yapıldı. 0, 2, 4, 6, 8, 24. saat aralıklarında membrandan geçen süzüntü de peptit analizi bölüm 3.10 da belirtildiği gibi yapılarak trans dermal emilim ölçüldü. Zaman aralıklarında kümülatif derişimin zamana bağlı olarak artış gösterdiği bulundu. Şekil 4.35’de gösterildiği gibi 24.saat sonunda 30,58 ppm PEP3’ün emilim gösterdiği hesaplandı.



Şekil 4.35 PEP3yükü KLN in vitro difüzyon çalışmasının grafik olarak gösterilmesi.

#### 4.11 In Vitro Toksikolojik Testlerin Değerlendirilmesi

##### 4.11.1 Fototoksisite- In Vitro 3T3 NRU fototoksisite testi sonuçları

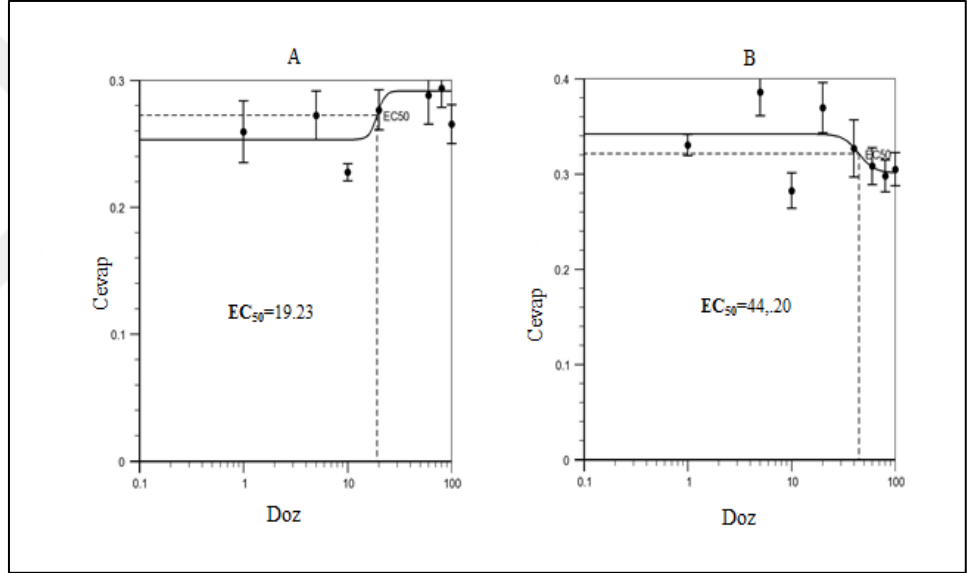
Işık varlığında (+UVA) ve yokluğunda 8(-UVA) farklı konsantrasyonlarda ölçülen optik dansite değerlerine göre (Çizelge 4.5 ve 4.6) Photox Version 2 programı ile konsantrasyon-cevap eğrileri elde edildi. EC<sub>50</sub> değerleri bulundu (Şekil 4.36). Fotoiritasyon Faktörü (PIF) bölüm 3.14.1' de verilen formulasyona göre hesaplandı.

Çizelge 4.5 UVA ışık yokluğunda (-UVA) 3T3 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda ölçülen OD değerleri. (n=6).

Kontrol	0.252	0.248	0.327	0.347	0.358	0.342
100 µg/ml	0.285	0.269	0.293	0.391	0.268	0.324
80 µg/ml	0.292	0.301	0.216	0.304	0.340	0.335
60 µg/ml	0.266	0.302	0.244	0.320	0.325	0.393
40 µg/ml	0.215	0.281	0.299	0.328	0.420	0.418
20 µg/ml	0.298	0.403	0.269	0.377	0.437	0.434
10 µg/ml	0.345	0.306	0.215	0.304	0.229	0.296
5 µg/ml	0.313	0.419	0.308	0.469	0.370	0.437
1 µg/ml	0,32	0.347	0.354	0.290	0.305	0.366

**Çizelge 4.6** UVA ışık varlığında (UVA+) 3T3 hücrelerinde farklı konsantrasyonlarda ölçülen OD değerleri. (n=6).

Kontrol	0.314	0.375	0.209	0.292	0.363	0.237
100 µg/ml	0.243	0.226	0.226	0.323	0.306	0.269
80 µg/ml	0.239	0.268	0.322	0.343	0.321	0.270
60 µg/ml	0.206	0.283	0.247	0.281	0.337	0.376
40 µg/ml	0.390	0.320	0.351	0.271	0.291	0.292
20 µg/ml	0.319	0.260	0.333	0.277	0.249	0.222
10 µg/ml	0.217	0.239	0.201	0.253	0.223	0.233
5 µg/ml	0.222	0.227	0.276	0.355	0.307	0.247
1 µg/ml	0.207	0.235	0.212	0.307	0.225	0.371



**Şekil 4.36** UVA ışığı varlığında ve yokluğunda doza bağlı olarak cevap ve EC 50 değerlerinin gösterilmesi. A= UVA+ , B= UVA-

-UVA grup da EC<sub>50</sub> değeri 44,20, +UVA grup da EC<sub>50</sub> değeri 19,20 olarak bulunmuştur. PIF değeri 2.31 olarak hesaplandı (Şekil 4.36).

#### 4.12 Bakteriyel Geri Mutasyon Ames Testi Değerlendirmesi

EBPI firmasından temin edilen Amest ISO 384<sup>TM</sup> (384 Well Format) test kiti ile bölüm 3.14.2 de kit prosedürlerine göre analizler yapıldı ve sonuçlar değerlendirildi.

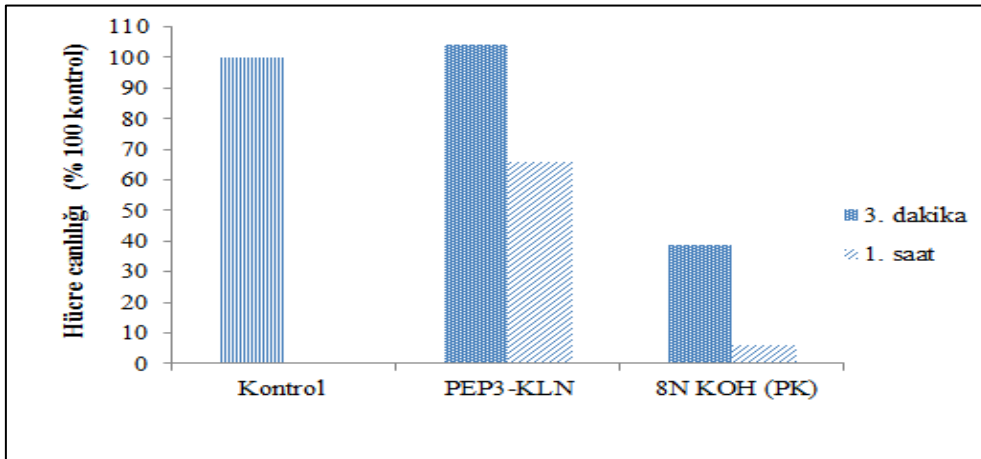
**Çizelge 4.7** PEP3-KLN 'nin S9'suz ortamdaki TA100 suşu ile verdiği revertant koloni sayıları. (Ort: Ortalama, SS: standart sapma)

PEP3 yüklü KLN Konsantrasyonu	Revertant Koloni Sayısı TA100 (Ort±SS)
80µg/ml	3,33 ± 1,15
40µg/ml	3,30 ± 0,57
20µg/ml	3,34 ± 0,58
10µg/ml	3,30 ± 1,52
5 µg/ml	2,6 ± 1,5
1 µg/ml	2,6 ± 0,98

TA100 suşu ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9'suz ortamda tüm çalışma konsantrasyonlarında revertant koloni sayıları 15 kuyucuktan az bulunmuştur. PEP3-KLN'nin mutajenik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir.

#### 4.13 *In Vitro* Epiderm™ Deri Korozyon Testi Değerlendirmesi

Epiderm™ Deri Korozyon Test kiti MatTek Corporation firmasından temin edildi. Deneysel çalışmalar test kitinde belirtilen prosedürler çerçevesinde yapıldı. Bölüm 3.10.3 de belirtildiği gibi değerlendirme yapıldı. 3. dakikanın sonunda PEP3-KLN grubunda hücre canlılığı kontrol grubuna göre %4 oranında arttığı bulundu. 1. saatin sonunda da kontrol grubuna göre %35 oranında azaldığı tespit edildi (Şekil 4.37).



**Şekil 4.37** PEP3 yüklü KLN yapısının zamana bağlı olarak koroziv etkisinin gösterilmesi.

Epiderm yapay deri modeli ile yapılan cilt korozyon testinde; PEP3-KLN bileşiminin 3.dakikanın sonunda negatif kontrole göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olmadığı ve 1. saatin sonunda % 15 den fazla hücre canlılığı olduğu için cilt korozyonu (non-corrosive) yapmadığı sonucuna varıldı.

#### **4.14 In Vivo Etkinlik Testleri**

İn vivo etkinlik testleri Skin Lab INTERNATIONAL Ltd. firması tarafından 13/06/18/D/1 ve 13/06/18/A/1 test numarası ile rapor edilmiştir (Bkz. Ek 1, EK2).

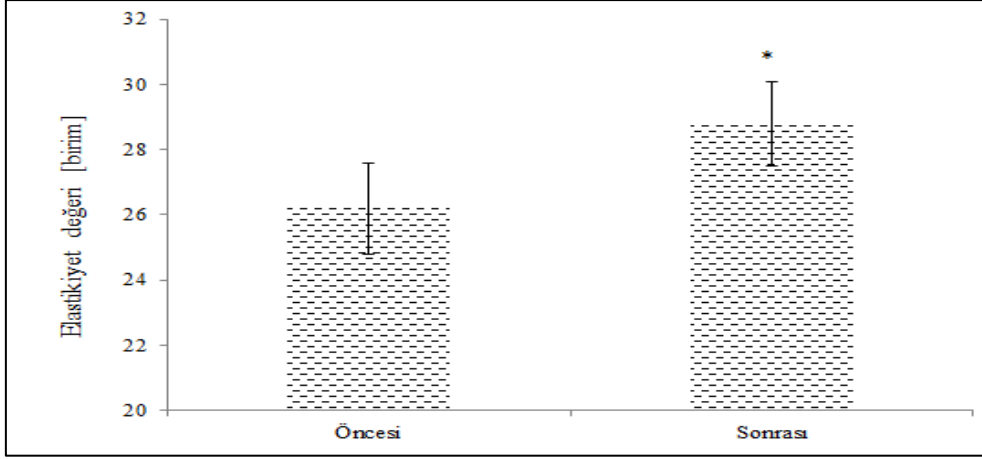
##### **4.14.1 Dermatolojik test (patch –yama testi) sonucu değerlendirilmesi**

Test yöntemi bölüm 3.15.1’de anlatıldığı gibi uygulandı. Dermatolojik test sonucunda cilt üzerinde tespit edilen kızarıklık, ödem, kuruluk ve dökülme gibi sonuçlara göre 0 ile 5 arasında (irritasyon yoktur-irritasyon vardır şeklinde) puanlama yapıldı. Yaşları 18 ile 62 arasında bayan gönüller üzerinde herhangi bir irritasyon yapmadığı rapor edildi (Bkz. Ek 1).

##### **4.14.2 Cilt elastikiyet (esneklik) testi değerlendirilmesi**

F1 formülasyonu, 10 gönüllü üzerinde 4 hafta günde 2 kez denendi. Süre sonunda kullanım öncesi ve kullanım sonrası elastikiyet değerlendirmesi yapıldı. %1 (w/w) oranında PEP3 yüklü KLN+ mannitol içeren F1 formülasyonun, kullanım öncesine göre % 9,92 oranında (Şekil 4.38) elastikiyeti arttırdığı bulundu (Bkz. Ek 2).



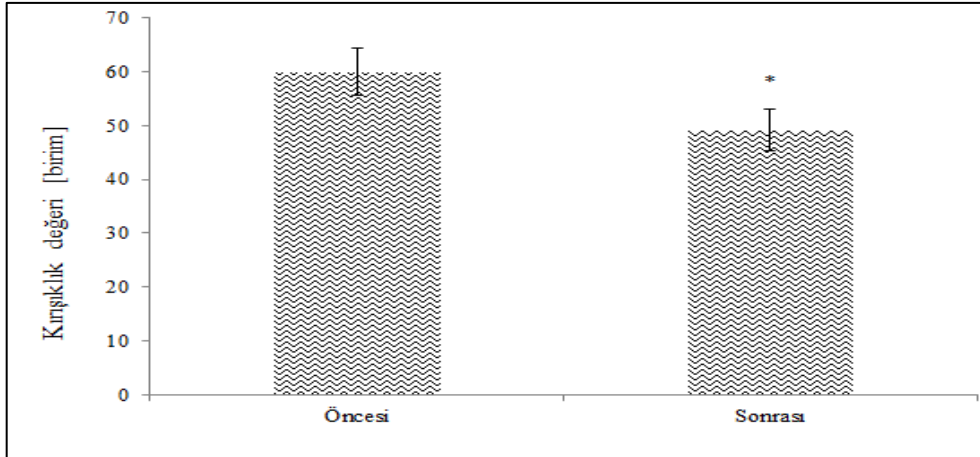


Şekil 4.38 F1 formülasyonun, kullanım öncesi ve sonrasında cilt elastikiyet testi dağılım grafiği.\*  $p < 0,01$ .

#### 4.14.3 Cilt kırışıklık testi (anti wrinkle) değerlendirilmesi

F1 formülasyonu, 10 gönüllü üzerinde 4 hafta günde 2 kez denendi. Süre sonunda kullanım öncesi ve kullanım sonrası kullanıcılar üzerinde kırışıklık değerlendirilmesi yapıldı.

%1 (w/w) oranında PEP3 yüklü KLN + mannitol içeren F1 formülasyonun, kullanım öncesine göre % 18,17 oranında (Şekil 4.39) cilt kırışıklığını azalttığı bulundu (Bkz. Ek 2).



Şekil 4.39 F1 formülasyonun, kullanım öncesi ve sonrasında cilt kırışıklık testi dağılım grafiği. \*  $p < 0,05$ .

ASW 300 cihazı 30x büyütme ile gönüllü resmi alındı (Şekil 4.40)

### Öncesi Sonrası



Şekil 4.40 F1 formülasyonunun, kullanım öncesi ve sonrası ASW 300 cihazı ile alınan cilt görüntüleri.

## 5. TARTIŞMA

İnsanlığın doğuşu ile başlayan, güzellik veya güzel olma duyusu, Mısırlı'lardan ve Sümer'lerden bu yana 6000 yıldır hayatımızın içinde var olmaktadır. Güzellik arayışını edebiyatta, sanatta ve müzikte görmekteyiz. Güzelliğin sosyal etkilerinden büyülenen bilim adamları, araştırmalarını kozmetik bilimine entegre etmesiyle birlikte, kozmetik bilimi derin bir devrime maruz kalmıştır. Geleneksel bakış açısıyla “kavanozun içindeki umut” olarak görülen kozmetik ürünleri, bilimin ışığında tüketicinin taleplerini karşılayan, cilt hücrelerinde fizyolojik değişiklikler meydana getiren, etkin ürünler olarak karşımıza çıkmıştır.

21. yüzyılın anahtar teknolojisi olan biyoteknoloji, tüketicinin daha etkili ve güvenli ürün arayışları talepleri doğrultusunda, kozmetik endüstrisini etkisi altına almıştır. Tıp bilimi ve kozmetiğin bir araya gelmesiyle meydana gelen kozmesötik ürünler, cilt yaşlanmasını güzellik ürünleri ile yenmenin mümkün olabileceği kanısı tüketicinin zihninde yer edinmiştir. Bu anlamda biyoteknoloji ürün inovasyonu sağlaması açısından güzellik endüstrisinin büyümesine katkı sağlamıştır. Tüketici algısı açısından bakıldığında zaman, yeni bir kozmetik dalgası olarak ortaya çıkan biyoteknolojik kozmetik ürünlerin, geleneksel ürünlere göre daha güvenli ve daha etkili ürünler olması, karşı konulmaz konulmaz genç ve güzel görünüm vaadinden dolayı, önem arz etmektedir (Coresight Research, 2016).

Kozmetik markalar, biyoteknoloji ve ilaç firmaları, ürün yeniliklerini teşvik etmek için yeni teknolojilere büyük yatırımlar yapmaktadırlar. Bilimsel araştırmalara ve yeni teknolojiye yapılan yatırımlarla, güzellik ürünleri ile cildin yaşlanmasını “yenmek” giderek daha fazla mümkün hale gelecektir. Biyomimetik, 3D biyoprinting, genetik ve kök hücre teknolojileri, gelecekte güzellik sektöründe araştırma odak alanları olacaktır.

Gelişmişlik düzeyi yüksek olan ülkelerde, yaşlı nüfus hızla artmakta, bunun sonucu olarak, yaşlanmanın belirtilerini minimize etmek için, anti aging ürünlerin kullanımı ve pazar payı da artmaktadır (Zouboulis and Makrantonaki, 2011). Kozmetik ürün kullanımının 2020 yılında orta yaş segmentinden, genç segment diye

tabir edilen 20-34 yaşlara kayacağı düşünülmektedir. Genç neslin ileri teknoloji içeren, sosyo-psikolojik rahatlamaya neden olabilecek, yüksek güvenlik standartlarında üretilen ve geliştirilen ürünlere ilgisi artacaktır. Yaşlanma karşıtı (anti aging) cilt bakım ürünlerinde yıllık % 6 lık bir büyüme hacmine sahip olması, yaşlanma karşıtı ürünlerde yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Aktif bileşenlerin deri altına bozulmadan geçebilmesi için kozmetik sektörü nanoteknoloji ile hibrit teknolojiler meydana getirmiştir (Katz et al., 2015). Yeni nesil cilt bakım ürünleri, yenilikçi deri altı iletim sistemleriyle birlikte fonksiyonel aktif bileşenleri kullanarak, yaşlanma mekanizmalarını hedeflemektedir (Golubovic et al., 2011).

Yaşlanma karşıtı ürün geliştirme stratejilerine bakıldığında, fonksiyonerlik ve etkinlik vurgusu önem arz etmektedir. Günlük yaşlanma karşıtı cilt bakımına peptitler eklemek, özellikle en etkili içerik dağıtım sistemleriyle birleştirildiği zaman daha sofistike ürünler olarak karşımıza çıkmaktadır. Gıda alanında glutensiz ürünler ne kadar cazip ise “cilt bakım dünyasında peptit içeren ürünler o kadar değerlidir. Son yıllarda tüketiciler özellikle ambalajlar üzerinde “peptit” adını aramaktadırlar. Peptitler gelecek için ümit vaat eden, çok yönlü yaşlanma karşıtı bileşen haline gelmektedir. Özellikle yaşlanma karşıtı ürünlerde meydana gelen % 6 oranında ki büyüme, yeni stratejileri ve ürünleri beraberinde getirecektir.

Bu anlamda tez çalışmasında; zaman içinde ortaya çıkan kaçınılmaz biyolojik bir süreç olarak deri yaşlanmasına karşı geciktirebilir ve engellenebilir (Kammayer and Lutein, 2015) ürünler ortaya çıkarma amacıyla MMP-12 enziminin inhibisyonuna yönelik inhibitör peptit dizayn edilmiştir. MMP’lar, ESM devamlılığını ve bütünlüğünü sağlayan kollajen, elastin, laminin ve fibronektin proteinlerinin yıkımını arttırarak, cildin yaşlanma belirtisinin dışa yansması olan kırışıklıkların artışına neden olmaktadır (Taddese et al., 2008).

Yirmibeş yıl önce, geniş ölçüde kollajenaz (matriks metalloproteinaz (MMP) 1), stromelisin-1 (MMP3) ve jelatinaz A'nın (MMP2) inhibisyonu kanser kontrolüne yönelik terapötik strateji ile başlamıştır (Overall and Kleifeld, 2006).

Batimastat, peptidomimetik inhibitör olarak, kanser tedavisinde klinik denemelere ulaşan ilk peptittir. Batimastat, MMP'ler -1, -8 ve -13 ile proteolize edilen kollajen içindeki glisin-lösin bölünme bölgesine dayanılarak tasarlanmıştır. (Cathcart and Cao, 2015). Peptit bazlı MMP-1, 2, 9 ve MT1-MMP'a inhibitörleri kullanılmıştır (Ndinguri et al., 2012). MMP-12 için peptit yapısında olmayan inhibitör tasarımları yapılmıştır (Morales et al., 2004).

Aerts ve ark.'ları (2015) anti inflamatuvar amaçlı hidroksipron bazlı, potansiyel ve spesifik MMP-12 inhibitörünün sentezi ve validasyonu ile ilgili çalışmalar yapmıştır. Yalancı peptit olarak MMP-12 ye özel inhibitör olarak dizayn edilen RXP470 bileşiği atheroskleritik plakların tedavisi amaçlı çalışmalarda kullanılmıştır (Bordenave et al., 2016).

Bileşik 21, MMP-2 ve MMP-9'a MMP-1, MMP-3, MMP-8, MMP-12 ve MMP-13'den daha fazla seçiciliğe sahip bir karbamoil fosfonat MMP inhibitörüdür. Bileşik 21, immün yetmezlikli farelerde insan prostat tümör hücrelerinin implantasyonu ile üretilen bir murin modelinde tümör büyümesini ve metastazı azaltır (Liu and Khalil, 2017).

MMP enzimlerinin ESM içerisinde cilt yapısı için gerekli olan proteinleri degrade etmesi, araştırmacıları MMP inhibitörlerinin de kozmetik alanda kullanabileceği fikrini vermiştir. 2000 yılından bu yana, kozmesötik ürünlerdeki peptitlerin kullanımı çarpıcı bir şekilde artmıştır. Bu peptitlerin inhibisyondan daha çok, ESM içerisinde bulunan proteinlerin miktarlarını arttırmaya yönelik olan çalışmalar olduğu görülmektedir. (Katayama et al., 1999; Murphy and Poczatek, 2000; Gorouhi and Maibach, 2009).

Bakır tripeptit kompleksi (Bakır Gly-L-His-L-Lys) en iyi incelenen peptitler arasındadır. MMP-2 üzerinden fibroblast hücre kültürü ile yapılan çalışmalarda MMP-1, 8 ve 13'ü degrade ettiği gösterilmiştir (Badenhorst et al., 2016). Tripeptit-2'nin MMP-1, 3 ve 9'u inhibe ettiğini ve foto yaşlanma ve kronolojik yaşlanmada görülen aşırı dermal matriks yıkımını en aza indirdiğini gösterilmiştir (Loing et al., 2012).

Solabia firması tarafından Peptiskin ticari adı ile biyoteknolojik enzimatik proses ile üretilen oligopeptit MMP-1 enzimi inhibisyonu yapmaktadır (Peptiskin, 2018).

Bu veriler ışığında literatür taramaları, patent (Ege Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisinin yapmış olduğu patent araştırma sonuçlarına göre; araştırma türü olarak; yenilik araştırması, rakip araştırması, benzerlik araştırması yapılmıştır. Veritabanı Espacenet, patent bilgi servisi olarak ta PatBase kullanılmıştır) ve piyasa araştırmaları sonucunda, MMP-12 enzimine yönelik olarak anti-aging amaçlı peptit sentezinin ve üretiminin olmadığı görülmektedir. İnovatif üretim stratejileri açısından ar-ge ve yenilik stratejisi ve fırsatları izleme stratejisi takip edilerek peptit tasarımı yapılmış ve sentezlenmiştir.

Tez kapsamında tasarlamış olduğumuz, PEP1, PEP2 ve PEP3 oligopeptitlerin MMP-12 enzimine özel inhibitör tarama testi ile inhibisyon düzeyi ölçülmüştür. 6,5  $\mu$ M konsantrasyonda PEP1'in % 5,91, PEP2'nin %25,26 ve PEP3'ün % 22,58 oranında inhibisyon yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6 ve 4. 7). Bu sonuçlar üzerinden 13  $\mu$ M PEP2 ve PEP3 konsantrasyonunun sırasıyla %87,83 ve % 88,05 oranında inhibisyon yaptığı ölçülmüştür (Şekil 4.10 ve 4.11). Maliyet avantajından ve daha az aminoasit dizisi içermesinden dolayı tezimizde belirtilen deneyler, PEP3 olarak adlandırılan peptit dizilimi üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığının devamı için yapılan proliferasyon deneyinde HS68 hücre hatlarında PEP3'ün hücre büyümesi üzerine olumsuz etkisinin olmadığı gözlenmiştir. 20  $\mu$ g/ml PEP3 konsantrasyonda 72. saatin sonucunda kontrol grubuna göre hücre büyümesinin anlamlı bir şekilde arttığı istatistiksel olarak bulunmuştur (Şekil 4.13). Park ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada gallolil-RGD peptit yapısının insan keratınosit hücreleri üzerinde 1000 ppm düzeyinin sitotoksik etkisinin olduğu bulunmuştur.

İmmun floresan boyama yöntemiyle yapılan deneylerde kollajen I, IV, elastin ve fibronektin proteinlerinin boyama yoğunluğunun kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda artış gösterdiği gözlenmiştir. MMP-12; elastin, kollajen tip IV ve fibronektin gibi birçok ESM proteinini degrade etmektedir (Amar et al., 2017).

Immun floresan ve Western blot deneylerinde kontrol grubuna göre kollajen I, IV, elastin ve fibronektin proteinlerinin miktarında meydana gelen artış tasarlanmış olduğumuz peptit yapısının yaşlanma karşıtı ürün stratejilerine farklı bir bakış açısı getirmektedir. Western blot analizlerinde, özellikle 10 µg/ml PEP3 konsantrasyonunda dört protein içinde istatistiksel olarak kontrol grubuna göre artış göstermiştir (Şekil 4.23, 4.25, 4.27 ve 4.29). İnhibitör tarama testinde PEP3'ün 13 µM konsantrasyonda %88 oranında MMP-12 yi inhibe etmesi, sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğunu göstermektedir. 13 µM konsantrasyonun yaklaşık olarak 9,5 µg/ml ye karşılık gelmesi bu konsantrasyonda *in vitro* koşullarda yeterli etkinliğin alındığını göstermektedir.

MMP-12, elastine karşı en etkili MMP'dir. Makrofajlar ve fibroblastlar, akut UVA ışığına tepki olarak MMP-12 salgırlar. MMP-12 solar elastoz gelişiminde çok önemli bir rol oynar. Güneş elastosisi süreci, dermiste distrofik elastotik madde toplanması anlamına gelir ve direk olarak cilt kırışıklığının artması ile sonuçlanır. MMP-12 ayrıca pro-MMP-1, MMP-2, MMP-3 ve MMP-9 gibi diğer pro-MMP'lerin aktivasyonundan sorumludurlar (Sbardella et al., 2012; Pittayapruet et al., 2016). MMP-12 seviyeleri, melanom hücresi invazyonu, lenf nodu metastazı ve tümör metastazı ile ilişkilidir. Melanomlu hastaların prognozu için potansiyel bir belirleyicidir (Zhang et al., 2015). Bu açıdan bakıldığı zaman PEP3 oligopeptit diziliminin aynı zamanda terapötik amaçlı olarak da kullanılabileceği fikrini vermektedir.

Literatür taramaları sırasında gözlemlediğimiz dermokokozmetik amaçlı çalışmaların genellikle ESM proteinlerinin ekspresyonu üzerine olması fakat onları degrade eden enzimlerin inhibisyonuna yönelik çalışmaların az olması tezin üstünlüğünü ortaya koymaktadır. Ticari ürünlerde MMP 1, 3, 9 ve 13 üzerine inhibisyon çalışmalarının yapıldığı görülmüştür. (Gorouhi and Maibach, 2009; Loing et al., 2012; Pickart and Schagen, 2015). Lu ve ark. (2013) dermal fibroblastlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada lipoik asit-KTTKS peptit diziliminin MMP-1 enzimini inhibe ettiğini ve kollajen I miktarını arttırdığını bulmuşlardır.

Kollajen I, III ve fibronektin sentezini, dermatan sülfat ve kondrotin sülfat miktarını, cilt fibroblast proliferasyonunu artırmaya yönelik peptit dizilimleri kullanılmaktadır (Reddy et al., 2012). Kwon ve ark. (2015) HS 68 hücrelerinde yaptıkları çalışmada miristoil tetrapeptidin MMP-1 ekspresyonunu azalttığını ve hücrelerde sitotoksik etkiye neden olmadığını göstermişlerdir. Çalışmaların daha çok kollajen, elastin sentezini arttırmaya, melanin üretimini azaltmaya ve anti-mikrobiyal kullanıma yönelik olduğu görülmüştür (Reddy et al., 2012). UVA ışını ile fotoyaşlanma olayında MMP-12'ye özel inhibe edici yaklaşımlar ortaya çıkarmak geleceğe yönelik stratejiler arasında yer almaktadır. Özellikle ESM remodelling (yeniden yapılanma) olayında MMP-12' nin önemi çok büyüktür (Tewari et al., 2014).

MMP-12 inhibitörü olarak peptit kökenli olarak fosfonik peptitlerin, (Devel et al., 2006) akciğer hastalıklarında ve kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan ve optimizasyon çalışmaları araştırmalar ile yapılan hidroksamat ve karboksilat (Nutti et al., 2018) türevleri bulunmaktadır.

MMP-12, kollajen IV'ü  $\alpha 1$  ve  $\alpha 3$  zincirlerini degrade eder (Sandy et al., 2013). Tez çalışmasında PEP3'ün MMP-12 inhibisyonu ile kollajen IV düzeylerinde artış gözlenmiştir. Yaşla beraber kollajen IV miktarında meydana gelen azalma epidermal ve dermal birleşimi de azaltmaktadır. Feru ve ark.'ları (2016) yaşları 40-70 arasında olan insanlarda yapmış oldukları araştırmaya göre fibroblast hücrelerinde kollajen IV miktarlarında azalış bulmuştur. Kollajen IV miktarında artış meydana getirebilecek yaklaşımlar, önem arz etmektedir. Epidermis ve dermis arasında köprü görevi gören kollajen IV'ü korumak fizyolojik yaşlanma olayının etkilerini minimize etmesi açısından önemlidir (Abreu-Velez and Howard, 2012).

Fibronektin, ESM'nin karmaşık bir bileşenidir. Fibroblast büyümesini, yayılmasını, migrasyonunu artırır (Gildner et al., 2014). Fibronektin, yara iyileşmesinde ve ESM organizasyonunda ve stabilitesinde kritik bir rol oynamaktadır. *In vitro* çalışmalar fibronektinin, kollajen I'in ve diğer yapısal proteinlerin ESM içerisinde tutunmasında gerekli olduğunu ortaya koymuştur (Sottile and Hocking, 2002).



Yun (2014) ve Lai (2012) ark. yapmış oldukları çalışmalarda MMP-12'nin fibronektini degrade ettiğini göstermişlerdir. Fibronektinin fibroblast aracılığıyla kollajen kontraksiyonunda (Sethi et al., 2002) rol oynaması deri yaşlanması açısından fibronektinin korunması için önem arz etmektedir.

Geliştirmiş olduğumuz PEP3 (Dervatyl<sup>TM</sup>) oligopeptit yapısının yukarıda verilen sonuçları etkili bir şekilde *in vivo* ortamda da gösterebilmesi için transdermal geçişini hızlandırabilmek ve proteolitik enzimler tarafından bozunumunu azaltmak için, penetrasyon artırıcı olarak KLN sistemleri ile kapsüllenmiştir. KLN'lerin, partiküllerin küçük boyutu ve dolayısıyla yüksek yüzey alanı nedeniyle aktif maddelerin stratum korneum ile temasını kolaylaştırmak konusundaki kapasitesi, taşınan maddelerin deriye yüksek oranlarda nüfuz etmesini sağlamaktadır (Raj et al., 2012 ).

KLN sistemleri ile vitaminler bitkisel özler, yağlar, polipeptit yapıları kapsüllenmiş ve kozmetik amaçlı olarak piyasada kullanılmaktadırlar (Ganesan and Choi, 2016; Kaul et al., 2018). 200 nm boyutundaki KLN lerin 1 µm ye göre % 40 oranında cilde daha fazla penetre olduğu bulunmuştur. Daha fazla yüzey alanı oluşturması ile epidermal su kaybını azaltmıştır (Souto and Muller, 2008). Suter ve ark.'nın (2016) yapmış olduğu çalışmada hepta peptit yüklü KLN yapısının cilt hücrelerine emiliminde etkili sonuçlara ulaşılmıştır

Mikrofluidik (mikro akışkan) yöntemi ile yapılan kapsülasyon çalışmalarında, homojen kapsül elde edilmesi endüstriyel üretim süreci açısından önem arz etmektedir. Geliştirilen ürünün sürdürülebilir olması açısından bu yöntem tercih edilmiştir (Bjornmalm et al., 2014). *LC-MS/MS* analizi ile enkapsülasyon verimi % 59,92 olarak ölçümlenmiştir. Kitosan türevli yapılan nanolipozomlarda pACC1 peptidin yükleme kapasitesi peptit-kitosan kapasitesine bağlı olarak %41 ile % 66 arasında bulunmuştur (Kaliaperumal et al., 2016). Gallarate ve ark. (2014) KLN ile insülin kapsülasyonunda % 41 oranında kapsülasyon verimine ulaşmışlardır.

Tez çalışmasında MF ile kapsülasyondan önce kapsül büyüklüğü 65,90 nm, PEP3 yüklü KLN büyüklüğü ise 128,02 nm olarak ölçülmüştür. TEM analizlerinde KLN yapısının küresel ve homojen bir şekilde dağılım gösterdiği görülmektedir.

(Şekil 4.32). Yu ve ark. (2011) ile aynı kapsülasyon modelinde siRNA yüklü KLN boyutunu 220-280 nm arasında bulmuşlardır. Xu ve ark. (2011) polietilen glikol ve kolesterol içeren lipozom çalışmasında 193 nm boyutunda nanopartikül elde etmişlerdir. Peptit kapsüllemesi için farklı lipitler üzerinden farklı lipozom ve KLN modelleri oluşturulmuştur (Du and Stenzel, 2014; Martins et al., 2007; Miragoli et al., 2018; Wong et al., 2018).

KLN yapısında kullanılan yumurta PC doğal bir lipit olarak, biyo yararlanımın yüksek olması, sitotoksik etkisinin ve sistemik toksistesinin az olması açısından önemlidir (Hoppel et al., 2015). Hücre sel alımı artırır ve enkapsülasyon verimini yükseltir. KLN yapısında polietilen glikol kullanılmasıyla Şekil 3.1'de gösterildiği gibi deri yüzeyine kapsülün tutmasını artırır (Dhule et al., 2014). Seramitle birlikte termal stabilite sağlanarak deri altında uzun süre dayanımını ve dolayısıyla salınımını kontrol etmektedir. Aynı zamanda epidermis tabakasında bulunan seramit yapısına katkıda bulunarak, KLN yapısı derinin epidermal su kaybını engelleyerek elastikiyet kaybının azalmasına neden olmaktadır (Draelos, 2008; Rabionet et al., 2014). KLN yapısında bulunan DOTAP'ın polietilen glikol ve seramit ile birlikte kullanılmasının sonucu olarak sisteme kazandırmış olduğu pozitif yük ile etken maddenin hücre sel alımını da attırmaktadır (Lechanteur et al., 2016). Polietilen glikollenmiş seramit ile oluşturulan nanopartiküllerin düşük sterik engel oluşturmasından dolayı siRNA (Furst et al., 2016) ve miRNA salınımında etkin rol oynadığı bulunmuştur (Li et al., 2018).

Kusumoto ve ark. (2012) yapmış oldukları gen transferi çalışmasında PEG-kolesterol lipozomların sadece kolesterol ile yapılan lipozomlara göre % 69 daha iyi penetrasyon yaptıkları bulunmuştur. Wieber ve ark. (2012), dekapeptit yapısında bir oligopeptiti kolesterol DOTAP kullanarak kapsüllemişler ve yükleme kapasitesini % 16 olarak bulmuşlardır. Li ve ark. (2018) ASKAIQVFLLAG peptit dizilimini DOTAP içeren KLN içine hapsederek yara iyileşmesi yönetiminde DOTAP içeren nanopartiküllerin etkin bir tedavi gücü olacağını belirtmişlerdir. DOTAP son yıllarda, katyonik yapı oluşturmada *in vitro* ve *in vivo* etkinliğinin bilinmesi açısından kullanılan en iyi moleküllerden biridir (Simberg et al., 2004).

KLN'ler, sulu dispers halde fiziksel ve kimyasal kararsızlıkları ve yapılarındaki fosfolipidler nedeniyle, oksitlenmeye veya hidrolize olmaya eğilimlidirler. KLN'ler de bu kimyasal dengesizliğinin yanı sıra, depolama sırasında füzyon, etken madde sızıntısı veya bileşenlerin çökmesi gibi fiziksel dengesizlikler ortaya çıkabilir (Mohammed et al., 2006). Bu kimyasal ve fiziksel dengesizliklerin üstesinden gelmek için, dondurularak kuru KLN yaklaşımları önemli bir gelişmedir (Wieber et al., 2012).

Tez çalışmasında stabilite çalışmaları için nanopartiküller  $-86^{\circ}\text{C}$  de 2 gün boyunca soğutmalı kurutma yöntemi ile farklı konsantrasyonlardaki kriyo protektantlar ile kurutulmuştur (Çizelge 4.2). Başlangıç (peptit yüklü) nanopartikül boyutuna göre, %10 (w/v) mannitol ile kurutulan nanopartiküllerin en az büyüme oranına sahip olduğu tespit edilmiştir. Kurutma sonrası /kurutma öncesi oranının 1.3 dan büyük olmaması gerekmektedir (Date et al., 2010).

KLN yapısında bulunan polimer ve stabilize ajanlara göre kriyoprotektanlar değişebilmektedirler (Abdelwahed et al., 2006). Li ve Kim (2002) yapmış oldukları çalışmada stabilize edici ajan olarak yumurta PC ve kritoprotektan olarak % 5' lik sukroz kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz %5'lik sukroz dondurma öncesi KLN büyüklüğünde 1,53 oranında artış meydana getirmiştir. Naguib ve ark. (2014) yumurta PC kullandıkları KLN yapısında mannitolü penetrasyon arttırıcı olarak kullanmışlardır (Naguib et al., 2014). Kumar ve ark. (2016) %10'luk mannitol ile KLN kurutmuşlardır.  $30^{\circ}\text{C}$  de 6 aylık stabilite çalışmaları sonucunda başlangıca göre partikül büyüklüğü ve PDI değerinde istatistiksel olarak artış meydana gelmediğini ve mannitolun en iyi kriyoprotektan olduğunu çalışma sonucunda belirtmişlerdir. Alihosseine ve ark. (2015) kolesterol kullanarak hazırladıkları KLN yapısında en az büyüme ve agregasyonu % 5'lik mannitol ile yapılan kurutma işleminde bulmuşlardır.

ICH protokolleri gereği mannitol ile kurutulan nanopartiküllerin bölüm 3.10.1' de belirtildiği şekilde stabilite çalışmaları sonucunda 0. aya göre 3. ve 9. ayda  $4^{\circ}\text{C}$  ve  $25^{\circ}\text{C}$  sıcaklıklarda partikül boyutunda artış meydana gelmiştir. 3.ay  $40^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta ise agregatlaşmadan dolayı partikül boyutu 1184 nm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.2). del Pozo- Rodriguez ve ark.'da (2009) trehaloz şekeri

kullandıkları stabilite çalışmalarında 40 °C sıcaklıkta KLN yapılarını ölçememişlerdir. LC-MS/MS analizi ile 9. ayın sonunda ortama salınan PEP3 miktarı ölçümlenmiştir. 0. aya göre 9.ay 4 °C sıcaklıkta ortama salınan PEP3 miktarı 0,8 ppm, 25 °C da ise 1,4 ppm olarak ölçülmüştür. Date ve ark. (2010), 12 ay boyunca yapmış oldukları stabilite çalışmasında, nanopartikül boyutunda başlangıç ayına göre istatistiksel olarak artış gözlenmemiştir. Etken madde içeriğinin ise %90 oranında korunduğunu tespit etmişlerdir. Howard ve ark. (2012) 25 °C de sulu disperse sistemlerde yapmış oldukları çalışmada KLN yapısının stabil olmadığını ve etken madde kaybı olduğunu gözlemlemişlerdir. 4 °C'de saklanan liyofilize KLN'ler, tutarlı bir parçacık boyutu sergilemiş ve % 20'lik ilaç kaybı göstermiştir. Graverini ve ark. (2018) oluşturmuş oldukları KLN yapısının 1. ayda 4 °C ve 25 °C de fiziksel ve kimyasal stabilitesini koruduğunu belirtmişlerdir. Oluşturmuş olduğumuz KLN yapısı her ne kadar 0. aya göre büyüme gösterse de ortama salınan PEP3 miktarı açısından stabilitesinin ve yapısının korunduğunu göstermektedir.

*In vitro* difüzyon çalışmaları ve *in vivo* klinik etkinlik çalışmaları için peptit yüklü KLN'ler mannitol ile kurutulduktan sonra jel yapıda formüle edilmiştir. İlaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılan jel yapıcı maddelerin saf olmaları, formülasyondaki etkin maddeler ve yardımcı maddelerle geçimli olmaları, düşük konsantrasyonda kullanılmaları, ekonomik açıdan uygun, kolay temin edilebilir olmaları ve reolojik açıdan stabil olmalarından dolayı genellikle KLN içeren formülasyonlarda kullanılmaktadır.

*In vitro* transdermal salınım çalışmaları için kullanılan membran, polietersulfon ve polyoefin olmak üzere iki tabaka içeren ve hayvansal olmayan, sentetik ve dermatolojik çalışmalarda kullanılabilmesi açısından uygun bir modeldir. İnsan derisine yakın korelasyon göstermektedir (Uchida et al., 2016). *In vitro* transdermal çalışmalar için mebrandan geçen peptit miktarı 0. saate göre 24 saat boyunca artış göstermiştir. 2. saatte kümülatif akış  $\text{cm}^2$  başına 8,5 ppm olarak bulunurken, 24 saatte geçen PEP3 miktarı  $\text{cm}^2$  başına 30,58 ppm olarak bulunmuştur (Şekil 4.35). Zhang ve ark. (2014) domuz kulak derisi ile yaptıkları emilim çalışmalarında hidrofilik karakterde olan tetrapeptit-3 ve asetil heksapeptit-3 peptitlerinin zamana bağlı olarak transdermal salınımlarının arttığını

bulmuşlardır. Strat M membranının hidrofilik ve lipofilik maddeleri geçirmesi insan ve rat derileri ile yakın korelasyon göstermesi, bulunabilir ve ucuz olması salınım çalışmaları için tercih edilir hale gelmiştir (Haq et al., 2018; Uchida et al., 2016). Oluşturmuş olduğumuz KLN'nin partikül büyüklüğünün 200 nm den az olmasının sonucu olarak membrandan geçişi hızlı bir şekilde olmuştur. Dawgul ve ark. (2017) antimikrobiyal peptit salınım çalışmalarında da Strat M membran kullanmışlardır (Dawgul et al., 2017).

Gelişen ve Yeni Tanımlanan Sağlık Riskleri Bilimsel Komitesinin (SCENIHR, 2007) görüşleri, nanoteknoloji ürünlerinin olası olumsuz sağlık ve çevresel etkilerini değerlendirmek için mevcut risk değerlendirme yöntemlerini ele almaktadır. Bu amaçla *in vitro* şartlarda PEP3 yüklü KLN'nin toksikolojik yapısını belirlemek için belirtilen testlerden fototoksisite testi, bakteriyel geri mutasyon ames testi ve epiderm deri korozyon testi yapılmıştır.

PEP3 yüklü KLN sekiz farklı konsantrasyonda 3T3 hücrelerine 24 saat boyunca uygulanarak UVA ışığının varlığında ve yokluğunda nötral red boyasının hücre alımına bağlı olarak ölçülen optik yoğunluk değerleri kullanılarak EC<sub>50</sub> değerleri belirlenmiştir. PIF değeri 2,31 olarak bulunmuştur. OECD test kılavuzlarına göre PIF değerinin 5 den küçük olmasından dolayı PEP3 yüklü KLN yapısının fototoksik olmadığı sonucuna varılmaktadır. Bazı güneş filtreleri foto toksik potansiyeli olabilir (Kim et al., 2018). Sonucunda da hücre bazlı olarak oksidatif stresi arttırmaktadır (Hossy et al., 2017). Fototoksisiteye bağlı olarak meydana gelen fotogenotoksite, DNA hasarını ve fotoantijen miktarını arttırmaktadır (Onoue et al., 2017). KLN partiküllerin cilt yüzeyinde UV bloker (Wissing and Muller, 2001) olarak görev yapmasından dolayı, fotoaktiviteye bağlı olarak sito-toksikolojik reaksiyonlar gelişebilir. Bu yüzden KLN içeren kozmetik formülasyonların bu testi yaptırması gerekmektedir. Youssef ve ark. (2012) hiperisin yüklü katı lipid partiküllerin, hiperisinin fototoksik etkisini azalttığı bildirilmiştir (Youssef et al., 2012).

PEP3 yüklü KLN yapısının meydana getirdiği veya getireceği mutasyonları hücre düzeyinde belirlenmesi amacıyla ames testi kullanılmıştır. TA100 ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9'suz ortamda tüm çalışma

konsantrasyonların da revertant koloni sayıları 15 kuyucuktan az bulunmuştur (Çizelge 4.5). Kit yöntemine göre, PEP3 yüklü KLN'nin mutajenik etkiye sahip olmadığı tespit edilmiştir. Literatür taramalarında çinko oksit, titanyum oksit ve silika içeren nanopartiküllerin mutajenik etkilerine *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda bakılmıştır (Kwon et al, 2014).

Epiderm yapay deri modeli ile yapılan cilt korozyon testinde; PEP3 yüklü KLN bileşiğinin 3.dakikanın sonunda negatif kontrole göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olmadığı ve 1. saatin sonunda % 15 den fazla hücre canlılığı olduğu için cilt korozyonu (non-corrosive) yapmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.37). KLN içeren formülasyonların korozyon testlerinin yapıldığı çalışmalar mevcuttur (Choi et al., 2014; Padois et al., 2011). 100µg/ml konsantrasyonda PEP3 yüklü KLN nin sitotoksik etki göstermemesi ile aynı deney prensibine dayanan korozyon testi sonucunda hücre ölümünün % 50 de az olması deneyler arasında ki korelasyonu göstermektedir. *In vitro* düzeyde gerçekleştirmiş olduğumuz yukarıda bahsedilen toksikolojik testler açısından ürünümüz dermato-toksikolojik açıdan güvenilir bir ürün olduğunu göstermektedir. Kozmetik ürün formülasyonlarında kullanılan bileşenlerin toksisitesi ve ürünlerin sağlığına zara vermeyeceğine dair güvence, günümüz tüketim toplumu için önem arz etmektedir.

*In vivo* etkinlik testleri yapılan PEP3 yüklü KLN formülasyonunun herhangi bir irritasyona neden olmadığı görülmüştür (Bkz. Ek1). Bu sonuç yapay deri modeli ile yapmış olduğumuz cilt korozyon ve fototoksisite testi sonuçlarını destekler niteliktedir (Jirova et al., 2010). Şekil 4.37 de gösterildiği gibi nanomateryallerin güvenliği açısından PEP3 yüklü KLN yapısının nanotoksik olmadığı sonucuna varılmaktadır.

Cilt elastikiyet testinde %1 oranında PEP3 yüklü KLN+ mannitol içeren F1 formülasyonunun, kullanım öncesine göre % 9,92 oranında elastikiyeti arttırdığı bulunmuştur (Bkz. Ek 2). *In vitro* deneylerimizi destekler nitelikte PEP3 yapısının inhibisyona bağlı olarak kollajen I, IV elastin ve fibronektin miktarlarında meydana getirdiği artış, F1 formülasyonu içerisinde 10 ug/ml konsantrasyona karşılık gelen PEP3'ün 28 günlük kullanım sonrası elastikiyeti arttırması olumlu bir sonuçtur. Elastikiyet kaybına neden olan kollajen ve elastin proteinlerine ek olarak ESM de

bulunan hyalüronik asit dolgu materyalinin de formülasyonlarda bulunması gerekir. Hyalüronik asit, kollajen ve elastin proteinlerinin bir arada tutunması açısından önem arz etmektedir (Jegasothy et al., 2014). Elastikiyet için vitamin C ve B önemli bir kofaktördür (Pullar et al., 2017). Bu açıdan bakıldığı zaman, F1 formülasyonumuzun başarılı bir sonuç verdiği düşünülebilir. 10 ug/ml konsantrasyonda PEP3 formülasyonu düşünmemizin sebebi *in vitro* deneylerde göstermiş olduğu etkinliğe göre düşünülmüştür. Ticari olarak satışa sunulan tripeptit-10 sitrulinin, 40 ppm içeren formülasyonu 22 gönüllü üzerinde 28 gün kullanım sonrası plaseboya karşı cilt esnekliğinde %54 oranında artış gözlenmiştir (Puig et al.,2008).

F1 formülasyonu,10 gönüllü üzerinde 28 gün günde 2 kez denenmiştir. Kullanım öncesine göre % 18,17 oranında cilt kırışıklığını azalttığı bulunmuştur (Bkz. Ek 2). *In vitro* deneylerimiz destekler nitelikte olan sonuçlarımız, kollajen I, IV, elastin ve fibronektin proteinlerini artışını, *in vivo* denemelerde de kırışıklık azalışı olarak gözlemlemekteyiz.

Ticari anlamda örnek olması açısından; Matriksil™ ticari adı ile piyasaya sürülen Pal-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser dizilimi peptit yapısı kollajen I, IV, fibronektin ve glikozaminoglikanların sentezini arttırmaktadır. 6 ppm peptit konsantrasyonu içeren formülasyonun 23 gönüllü üzerinde denenmesinde sonra başlangıca göre 2. ay sonunda kırışıklık derinliğinde % 21,8 azalma, elastikiyette ise % 5,5 artış meydana gelmiştir (Matrixyl 3000).

Asetil octapeptit-3 ürünün % 10 içeren krem formülasyonun 10 gönüllü üzerinde 28 gün kullanılmasıyla anti aging test sonucunda başlangıca göre % 35 oranında cilt kırışıklıklarında azalma meydana gelmiştir (Lipotec,2008).

Bu veriler ışığında tezimizden elde edilen Dervatyl™ marka ürünün yenilikçi yönünü şu şekilde belirtebiliriz;

1) Ticari anlamda piyasada sunum ve arzı yapılan çok sayıda peptit kaynaklı ürün bulunmaktadır. Genellikle kendi içlerinde, farklı kategorilerde etkinlikleri çalışılmıştır. Bu ürünleri incelediğimiz zaman ESM içerisinde bulunan proteinlerin

arttırmaya yönelik etken maddelerin tasarlandığını ve geliştirildiğini görmekteyiz. MMP inhibisyonu üzerine tasarlanan peptit yapılarının sınırlı sayıda olduğunu ve MMP-12 için inhibitör peptit kullanan ticari ürünlerin olmadığını görmekteyiz. Peptit kullanımının gelecekte cilt bakımında çok güçlü bir ajan olarak kullanılacak olmasından dolayı ürünümüz teknolojik dışa bağımlılığımızı azaltması ve rekabet gücümüzü arttırması açısından önemlidir.

2) Dervatyl marka ürünümüz ürün stratejisi açısından yenilik sunmaktadır. PEP3'ün KLN sistemi ile kapsüllenmesi, ürünümüzün teknolojik farkındalığını ortaya koymakta ve "kritik faydayı sağlayan teknolojiyi" sunması açısından avantaj oluşturmaktadır.

3) Ürünümüzün biyoteknolojik yöntemlerle üretilmiş ve yüksek güvenilirlik düzeyine sahip etken madde olması, insan sağlığı ve yaşam kalitesini arttırmada yardımcı etkisi olacaktır.

4) Ülkemizin "teknolojik gelişmişlik indeksinin"nin yükselmesine ve küresel alanda ülkemizin marka değerinin artmasına olanak sağlamasına ve kozmetik konusunda vizyonunun olmasına neden olacaktır.

Dervatyl™ ürününün tüm paydaş ve potansiyel kullanıcıların faydalanabileceği ulusal kazanım ve olası çıktıları aşağıda tabloda açıklandığı şekilde sıralayabiliriz.



Tezin ulusal kazanım ve çıktıları	İlgili Sektör/Kurum/Kuruluş
<p>INCI (Uluslararası kozmetik etken madde adlandırma sistemine) veri tabanına kaydı gerçekleşecektir. Görsel proje tanıtım katalogu hazırlanarak, her yıl düzenlenen Kimya Arge Proje pazarı ve Türkiye İnovasyon Haftası etkinliklerinde girişimci ve yatırımcılarla ürünümüz buluşturulacaktır.</p> <p>Kozmetik hammadde geliştiren firmaların katıldığı bir arge fuarı olan “In cosmetics” (<a href="http://www.in-cosmetics.com">http://www.in-cosmetics.com</a>) fuarlarında, fuarın Innovation Zone bölümünde sergilenecektir.</p>	Kozmetik sektörü
<p>Kimyagerler Derneği ve Türk Dermatoloji Derneği tarafından düzenlenen ulusal ve uluslararası kongrelerde sözlü bildiri şeklinde sunum yapılması planlanmaktadır</p>	Kozmetik sektörü
<p>Proje Tanıtım Toplantılarının düzenlenmesi İKMİB (İstanbul Kimyevi Maddeler ve Mamulleri İhracatçıları Birliği)kozmetik tanıtım grubu</p>	Kozmetik sektörü
<p>Dermokozmetik preparatlarda (krem ve losyon) yaşlanma karşıtı kremler ve losyonlarda, lipit nanopartikül yapısından dolayı UV bloker olarak güneş kremlerinde,</p> <p>Kullanmış olduğumuz nanopartikül yapısında bulunan seramid bileşiğinden dolayı, nemlendirici kremlerde etken madde olarak kullanılabilir.</p>	Kozmetik sektörü
<p>Peptitlerin mikro iğne tekniği ile deri altı enjeksiyonunu içeren çalışmalar mevcuttur.</p>	Medikal estetik sektörü
<p>UV bloker ve nemlendirici özelliğe sahip olmasından dolayı atopik dermatit tedavisinde kullanılabilir.</p>	İlaç sektörü (dermatoloji)
<p>Tezimizin sonuçlarından biri de ilaç öncüllerinin elde edilmesine olanak sağlamasıdır. Özellikle UV bağlı cilt kanserlerinde engelleyici ajan olarak kullanılabilir.</p>	İlaç sektörü (kanser)

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

**Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S. and Fessi, H.,** 2006, Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations, *Adv. Drug Deliv. Rev*, 58, (15), 1688-1713pp.

**Abreu-Velez, A. M. and Howard, M. S.,** 2012, Collagen IV in normal skin and in pathological processes, *N. Am. J. Med. Sci*, 4 (1), 1-8pp.

**Aerts, J., Vandenbroucke, R.E., Dera, R., Balusu, S., Van Wonterghem, E., Moons, L., Libert, C., Dehaen, W. and Arckens, L.,** 2015, Synthesis and validation of a hydroxypyronone-based, potent, and specific matrix metalloproteinase-12 inhibitor with anti-inflammatory activity *in vitro* and *in vivo*, *Mediators Inflamm*, 510679p.

**Alihosseini, F., Ghaffari, S., Dabirsiaghi, A.R. and Haghighat, S.,** 2015, Freeze-drying of ampicillin solid lipid nanoparticles using mannitol as cryoprotectant, *Brazilian J. Pharm. Sci*, 51(4), 797-802pp.

**Arvelainen, H., Sainio, A., Koulu, M., Wight, T.N. and Penttinen, R.,** 2009, Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy, *Pharmacol Rev*, 61 (2), 198-223pp.

**Ashcroft, G.S., Herrick, S.E., Tarnuzzer, R.W., Horan, M.A., Schultz, G.S. and Ferguson, M.W.,** 1997, Human ageing impairs injury-induced *in vivo* expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA, *J. Pathol*, 183, 169–176pp.

**Badenhorst, T., Svirskis, D., Merrilees, M., Bolkel. and Wu, Z.,** 2016, Effects of GHK-Cu on MMP and TIMP Expression, Collagen and Elastin Production, and Facial Wrinkle Parameters, *J. Aging Sci*, 4,3.

**Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V. and Wolf, R.,** 2012, Structure and function of the epidermis related to barrier properties, *Clin. Dermatol*, 30 (3), 257-262pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Bjornmalm, M., Yan, Y. and Caruso, F.,** 2014, Engineering and evaluating drug delivery particles in microfluidic devices, *J. Control Release*, 190, 139-149pp.

**Bordenave, T., Helle, M., Beau, F., Georgiadis, D., Tepshi, L., Bernes, M., Ye, Y., Levenez, L., Poquet, E., Nozach, H., Razavian, M., Toczek, J., Stura, E. A., Dive, V., Sadeghi, M.M. and Devel, L.,** 2016, Synthesis and *in vitro* and *in vivo* evaluation of MMP-12 selective optical probes, *Bioconjug Chem*, 27, (10), 2407-2417pp.

**Bose, S., Du, Y., Takhistov, P. and Michniak-Kohn, B.,** 2013, Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems, *Int. J. Pharm*, 441 (1), 56-66pp.

**Bradford, M.M.,** 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248-54pp.

**Cammarano, M.** " The Future of Beauty", [https://www.fitnyc.edu/files/pdfs/CFMM\\_Beauty2010.pdf](https://www.fitnyc.edu/files/pdfs/CFMM_Beauty2010.pdf), (Erişim tarihi: 11 Şubat 2015)

**Carrino, D.A., Sorrell, J. M. and Caplan, A. I.,** 2000, Age-related changes in the proteoglycans of human skin, *Arch. Biochem. Biophys*, 373(1), 91-101pp.

**Cathcart, J. M. and Cao, J.,** 2015, MMP Inhibitors: Past, present and future, *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20, 1164-1178pp.

**Charcosset, C., Juban, A., Valour, J.P., Urbaniak, S. and Fessi, H.,** 2015, Preparation of liposomes at large scale using the ethanol injection method: Effect of scale-up and injection devices, *Chemical Engineering Research and Design*, 94, 508-515pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Choi, J., Kim, H., Choi, J., Oh, S. M., Park, J. and Park, K.,** 2014, Skin corrosion and irritation test of sunscreen nanoparticles using reconstructed 3D human skin model, *Environ Health Toxicol*, 29.

**Coresight Research,** “The Convergence of Science, Medicine and Beauty”, <https://www.funglobalretailtech.com/research/convergence-science-medicine-beauty-2016>, (Erişim tarihi: 13.06.2018).

**Cory, A.H., Owen, T.C., Barltrop, J. A. and Cory, J. G.,** 1991, Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture, *Cancer Commun*, 3(7), 207-12pp.

**Date, P.V., Samad, A. and Devarajan, P.V.,** 2010, Freeze thaw: a simple approach for prediction of optimal cryoprotectant for freeze drying, *AAPS PharmSciTech*, 11, 304-313pp.

**Dawgul, M. A., Greber, K. E., Bartoszewska, S., Baranska-Rybak, W., Sawicki, W. and Kamysz, W.,** 2017, *In vitro* evaluation of cytotoxicity and permeation study on lysine- and arginine-based lipopeptides with proven antimicrobial activity, *Molecules*, 22 (12).

**del Pozo-Rodriguez, A., Solinis, M. A., Gascon, A. R. and Pedraz, J. L.,** 2009, Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy, *Eur J. Pharm. Biopharm*, 71 (2), 181-189pp.

**Desai, P., Patlolla, R. and Singh, M.,** 2010, Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery, *Mol. Membr. Biol*, 27, 247–259pp.

**Devel, L., Rogakos, V., David, A., Makaritis, A., Beau, F., Cuniasse, P., Yiotakis, A. and Dive, V.,** 2006, Development of selective inhibitors and substrate of matrix metalloproteinase-12, *J. Biol. Chem*, 281, (16), 11152-11160pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Dhule, S.S., Penfornis, P., He, J., Harris, M. R., Terry, T., John, V. and Pochampally, R.**, 2014, The combined effect of encapsulating curcumin and C6 ceramide in liposomal nanoparticles against osteosarcoma, *Mol. Pharm*, 11 (2), 417-427pp.

**Dormán, G., Cseh, S., Hajdú, I., Barna, L., Kónya, D., Kupai, K., Kovács, L. and Ferdinandy, P.**, 2010, Matrix metalloproteinase inhibitors: critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility, *Drugs*, 70(8), 949-64pp.

**Draelos, Z. D.**, 2008, The effect of ceramide-containing skin care products on eczema resolution duration, *Cutis*, 81(1), 87-91pp.

**Du, A. W. and Stenzel, M. H.**, 2014, Drug carriers for the delivery of therapeutic peptides, *Biomacromolecules*, 15 (4), 1097-1114pp.

**Eiras, F., Amaral, M.H., Silva, R., Martins, E., Lobo, J:M. and Silva, A.C.**, 2017, Characterization and biocompatibility evaluation of cutaneous formulations containing lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm*, 519 (1–2), 373-380pp.

**EMA.**, 2003, ICH Topic Q 1 A (R2), Stability of new Drug Substances and Products, CPMP/ICH/2736/99, London, UK.

**Feru, J., Delobbe, E., Ramont, L., Brassart, B., Terryn, C., Dupont-Deshorgue, A., Garbar, C., Monboisse, J. C., Maquart, F. X. and Brassart-Pasco, S.**, 2016, Aging decreases collagen IV expression *in vivo* in the dermo-epidermal junction and *in vitro* in dermal fibroblasts: possible involvement of TGF-beta1, *Eur. J. Dermatol*, 26 (4), 350-360pp.

**Fields, G. B.**, 2013, Interstitial collagen catabolism, *J. Biol. Chem*, 288 (13), 8785-8793pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Fisher, G.J., Datta,S.C., Talwar, H.S., Wang,Z.Q., Varani, J., Kang, S. and Voorhees J.J.**,1996, Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature*, 379(6563), 335-9pp.

**Fitzpatrick,T.B., Johnson,R.A., Wolff, K. and Suurmond, D.**, 2001, Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology, McGraw-Hill Companies,1041p.

**Furst, T., Dakwar, G. R., Zagato, E., Lechanteur, A., Remaut, K., Evrard, B., Braeckmans, K. and Piel, G.**, 2016, Freeze-dried mucoadhesive polymeric system containing pegylated lipoplexes: Towards a vaginal sustained released system for siRNA, *J. Control Release*, 236, 68-78pp.

**Gallarate, M., Serpe, L., Foglietta, F., Zara, G.P., Giordano, S., Peira, E., Chirio, D. and Battaglia L.**, 2014, Solid lipid nanoparticles loaded with fluorescent-labelled cyclosporine A: anti-inflammatory activity *in vitro*, *Protein Pept Lett.*,21(11), 1157-62pp.

**Galvez, B.G., Matias-Roman, S., Albar,J.P., Sanchez-Madrid, F. and Arroyo, A.G.**, 2001, Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling, *J Biol Chem*, 276, 37491–37500pp.

**Ganceviciene, R., Liakou, A.I., Theodoridis,A., Makrantonaki, E. and Zouboulis C.C.**, 2012, Skin anti-aging strategies, *Dermatoendekrenol*, 4(3), 308-19pp.

**Ganesan, P. and Choi, D. K.**, 2016, Current application of phytochemical-based nanocosmeceuticals for beauty and skin therapy, *Int. J. Nanomedicine*, 11, 1987-2007pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Gazitaeva, Z.I., Drobintseva, A.O., Chung, Y., Polyakova, V.O. and Kvetnoy, I.M.**, 2017, Cosmeceutical product consisting of biomimetic peptides: Antiaging effects *in vivo* and *in vitro*, *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol*, 10, 11–16pp.

**Gildner, C. D., Roy, D. C., Farrar, C. S. and Hocking, D. C.**, 2014, Opposing effects of collagen I and vitronectin on fibronectin fibril structure and function, *Matrix Biol*, 34, 33-45pp.

**Giorgianni, F., Cappiello, A., Beranova-Giorgianni, S., Palma, P., Trufelli, H. and Desiderio, D. M.**, 2004, LC-MS/MS analysis of peptides with methanol as organic modifier: improved limits of detection, *Anal. Chem*, 76, 23, 7028-7038pp.

**Golubovic, L.N., Simon, S.R. and Shah, B.**, 2011, Nanotechnology use with cosmeceuticals, *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 30(3), 176-80pp.

**Hoppel, M., Juric, S., Ettl, H. and Valenta, C.**, 2015. Effect of monoacyl phosphatidylcholine content on the formation of microemulsions and the dermal delivery of flufenamic acid, *Int. J. Pharm*, 479, 70–76pp.

**Hossy, B. H., da Costa Leitao, A. A., Dos Santos, E. P., Matsuda, M., Rezende, L. B., Rurr, J. S. C., Pinto, A. V., Ramos, E. S. M., de Padula, M. and de Oliveira Miguel, N. C.**, 2017, Phototoxic assessment of a sunscreen formulation and its excipients: An *in vivo* and *in vitro* study, *J. Photochem. Photobiol B*, 173, 545-550pp.

**Gildner, C. D., Roy, D. C., Farrar, C. S. and Hocking, D. C.**, 2014, Opposing effects of collagen I and vitronectin on fibronectin fibril structure and function, *Matrix. Biol*, 34, 33-45pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Global Kozmesötikler Pazar Görünümü,**  
<http://giiresearch.com/report/rnc263147-global-cosmeceutical-market-outlook.html>,  
 (Erişim tarihi: 1 Ekim 2017).

**Gorouhi, F. and Maibach, H.I.,** 2009, Role of topical peptides in preventing or treating aged skin, *Int. J. Cosmet. Sci*, 31, 327-45pp.

**Grande, F. and Tucci, P.,** 2016, Titanium dioxide nanoparticles: a risk for human health, *Mini Rev. Med. Chem.* 16(9), 762-9pp.

**Graverini, G., Piazzini, V., Landucci, E., Pantano, D., Nardiello, P., Casamenti, F., Pellegrini-Giampietro, D. E., Bilia, A. R. and Bergonzi, M. C.,** 2018, Solid lipid nanoparticles for delivery of andrographolide across the blood-brain barrier: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 161, 302-313pp.

**Haq, A., Dorrani, M., Goodyear, B., Joshi, V. and Michniak-Kohn, B.,** 2018, Membrane properties for permeability testing: Skin versus synthetic membranes, *Int. J. Pharm*, 539,(1-2), 58-64pp.

**Hantash, B.M. and Jimenez, F.,** 2009, A split-face, double-blind, randomized and placebo-controlled pilot evaluation of a novel oligopeptide for the treatment of recalcitrant melasma, *J. Drugs Dermatol*, 8,732-5pp.

**Hendry, R.M. and Hermann, J.E.,**1984, Immobilization of antibodies on nylon for use in enzyme-linked immunoassay, *J. Immunol. Methods*, 35(3-4),285-96pp.

**Howard, M. D., Lu, X., Jay, M. and Dziubla, T. D.,** 2012, Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid-lipid nanoparticles, *Drug Dev. Ind. Pharm*, 38, (10), 1270-1279pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Hudson, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M. and Neilson, E. G.,** 2003, Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen, *N. Engl. J. Med.*, 348 (25), 2543-2556pp.

**Hwang, Y. P., Choi, J. H., Kim, H. G., Choi, J. M., Hwang, S. K., Chung, Y. C. and Jeong, H. G.,** 2012, Cultivated ginseng suppresses ultraviolet B-induced collagenase activation via mitogen-activated protein kinases and nuclear factor kappaB/activator protein-1-dependent signaling in human dermal fibroblasts, *Nutr. Res.*, 32, (6), 428-438pp.

**Jegasothy, S. M., Zabolotniaia, V. and Bielfeldt, S.,** 2014, Efficacy of a new topical nano-hyaluronic acid in humans, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, 7 (3), 27-29pp.

**Jeon, H.S., Seo, J.E., Kim, M.S., Kang, M.H., Oh, D.H., Jeon, S.O ,Choi, Y,W. and Lee ,S.,** 2013, A retinyl palmitate-loaded solid lipid nanoparticle system: effect of surface modification with dicetyl phosphate on skin permeation *in vitro* and anti-wrinkle effect *in vivo*, *Int. J. Pharm.*, 452 (1), 311-320pp.

**Jimenez, M. M., Pelletier, J., Bobin, M. F. and Martini, M. C.,** 2004, Influence of encapsulation on the *in vitro* percutaneous absorption of octyl methoxycinnamate, *Int.J. Pharm.*, 272, (1-2), 45-55pp.

**Jirova, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendova, H., Kejlova, K., Marriott, M. and Kandarova, H.,** 2010, Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, *Contact Dermatitis*, 62 (2), 109-116pp.

**Jones, P. H. and Watt, F. M.,** 1993, Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression, *Cell*, 73(4), 713-724pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Jose, J. and Netto, G.,** 2018, Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics, *J. Cosmet. Dermatol.* 13.

**Kaliaperumal, J., Hari, N., Pavankumar, P. and Elangovan, N.,** 2016, pACC1 peptide loaded chitosan nanoparticles induces apoptosis via reduced fatty acid synthesis in MDA-MB-231 cells, *Applied Nanoscience*, 6, (5)–615-27pp.

**Kalluri, H. and Banga, A.K.,** 2011, Transdermal delivery of proteins, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*,12,431-41pp.

**Kammeyer, A. and Luiten, R.M.,** 2015, Oxidation events and skin aging, *Ageing Res. Rev.*, 21, 16-29pp.

**Katayama, K., Seyer, J.M., Raghow, R. and Kang, A.H.,**1991, Regulation of extracellular matrix production by chemically synthesized subfragments of type I collagen carboxy propeptide, *Biochemistry*, 30, 7097-104pp.

**Katz, L. M., Dewan, K. and Bronaugh, R. L.,** 2015, Nanotechnology in cosmetics, *Food Chem. Toxicol.*, 85, 127-137pp.

**Kaul, S., Gulati, N., Verma, D., Mukherjee, S. and Nagaich, U.,** 2018, Role of nanotechnology in cosmeceuticals: A review of recent advances, *J. Pharm (Cairo)*,3420204p.

**Kaur, I.P. and Agrawal, R.,** 2007, Nanotechnology: a new paradigm in cosmeceuticals, *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 1(2), 171–182pp.

**Kim, D.W., Hwang, H.S., Kim, D.S., Sheen, S.H., Heo, D.H., Hwang, G., Kang, S.H., Kweon, H., Jo, Y.Y. and Kang, S.W.,** 2011, Effect of silk fibroin peptide derived from silkworm *Bombyx mori* on the anti-inflammatory effect of Tat-SOD in a mice edema model, *B.M.B. Rep.*, 44, 787–792pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Kim, H. J., Lee, E., Lee, M., Ahn, S., Kim, J., Liu, J., Jin, S. H., Ha, J., Bae, I. H., Lee, T. R. and Noh, M.,** 2018, Phosphodiesterase 4B plays a role in benzophenone-3-induced phototoxicity in normal human keratinocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 338, 174-181pp.

**Kim, K., Park, H. and Lim, K.M.,** 2015, Phototoxicity: its mechanism and animal alternative test methods, *Toxicol. Res*, 31(2),97-104pp.

**Kiper, M.,** 2013, Biyoteknoloji sektörel inovasyon sistemi kavramlar dünyadan örnekler türkiye’de durum ve çıkarımlar, TTGV, Ankara.

**Klingman, A.M., Grove, G.L., Hirose, R. and Leyden, J.J.,**1986, Topical tretinoin for photoaged skin, *J. Am. Acad. Dermatol*, 15, 836–859pp.

**Konugolu, V. S., S., Beh, J. S., Farina, A., Dalla Mora, A., Pifferi, A. and Taroni, P.,** 2017, Broadband diffuse optical characterization of elastin for biomedical applications, *Biophys. Chem*, 229, 130-134pp.

**Kumar, L., Meka, S.R., Verma, R. and Koteswara, K.B.,**2016, Selection of cryoprotective agent for freeze drying of valsartan solid lipid nanoparticles, *Latin Ame. J. Pharmacy*,35 (2), 284-290pp.

**Kusumoto, K., Akita, H., El-Sayed, A. and Harashima, H.,** 2012, Effect of the anchor in polyethylene glycol-lipids on the transfection activity of PEGylated cationic liposomes encapsulating DNA, *Biol Pharm Bull*, 35, (4), 445-448pp.

**Kwon, H. Ahn, E. Kim, S. Y. Kang, Y. Kim, M. O. Jin, B. S. and Park, S.,** 2016, Inhibition of UV-induced matrix metabolism by a myristoyl tetrapeptide, *Cell Biol. Int*, 40(3), 257-68pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

**Kwon, J.Y., Koedrith, P. and Seo, Y.S.,** 2014, Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models *in vitro* and *in vivo*: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations, *Int. J. Nanomedicine*, 9, 271–286pp.

**Lai, A., Ghaffari, A., Li, Y. and Ghahary, A.,** 2012, Microarray-based identification of aminopeptidase N target genes in keratinocyte conditioned medium-stimulated dermal fibroblasts, *J. Cell Biochem*, 13, 1061-1068pp.

**Lechanteur, A., Furst, T., Evrard, B., Delvenne, P., Hubert, P. and Piel, G.,** 2016, PEGylation of lipoplexes: The right balance between cytotoxicity and siRNA effectiveness, *Eur. J. Pharm. Sci*, 93, 493-503pp.

**Lephart, ED.,** 2016, Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms, *Ageing Res Rev*, 31, 36-54pp.

**Li, J., Ghatak, S., El Masry, M. S., Das, A., Liu, Y., Roy, S., Lee, R. J. and Sen, C. K.,** 2018, Topical lyophilized targeted lipid nanoparticles in the restoration of skin barrier function following burn wound, *Mol. Ther*, 26 (9), 2178-88pp.

**Li, Y., Chen, D. H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R. A., Zhang, Y., Biris, A. S., Heflich, R. H. and Chen, T.,** 2012, Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay, *Mutat. Res*, 745,(1-2), 4-10pp.

**Lim, S. J. and Kim, C. K.,** 2002, Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid, *Int. J. Pharm*, 243, (1-2), 135-146pp.

**Lipotec,** 2008., “Snap-8 Solution C”, [https://www.lotioncrafter.com/reference/tech\\_data\\_snap8c.pdf](https://www.lotioncrafter.com/reference/tech_data_snap8c.pdf), (Erişim tarihi: 28 Haziran 2018)

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Liu, J. and Khalil, R. A.**, 2017, Matrix metalloproteinase inhibitors as investigational and therapeutic tools in unrestrained tissue remodeling and pathological disorders, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*, 148, 355-420pp.

**Lu, C., Kim, B. M., Lee, D., Lee, M. H., Kim, J. H., Pyo, H. B. and Chai, K. Y.**, 2013, Synthesis of lipoic acid-peptide conjugates and their effect on collagen and melanogenesis, *Eur. J. Med. Chem*, 69, 449-454pp.

**Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C., Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C., Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhütter, H.G.**, 2000, The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin corrosivity testing, *Altem. Lan. Anim*, 28, 371-401pp.

**Lintner, K., Mas-Chamberlin, C. and Mondon, P.**, 2009, Cosmeceuticals and active ingredients, *Clin. Dermatol*, 27, 461–468pp.

**Lohan, S.B., Bauersachs, S., Ahlberg, S., Baisaeng, N., Keck, C.M., Müller, R.H., Witte, E., Wolk, K., Hackbarth, S., Röder, B., Lademann, J. and Meinke, M.C.**, 2015, Ultra-small lipid nanoparticles promote the penetration of coenzyme Q10 in skin cells and counteract oxidative stress, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 89, 201-207pp.

**Lohani, A., Verma, A., Joshi, H., Yadav, N. and Karki, N.**, 2014, Nanotechnology-based cosmeceuticals, *SRN Dermatology*, 14p.

**Loing, E., Suere, T. and Lamarque, E.**, 2012, Trifluoroacetyl-tripeptide-2 to target senescence for anti-aging benefits, *Cosmet. Toiletries*, 127, 274-81pp.

**Malerich, S. and Berson, D.**, 2014, Next generation cosmeceuticals: the latest in peptides, growth factors, cytokines, and stem cells, *Dermatol. Clin.*, 32(1), 13-21pp.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

**Manka, S.W., Carafoli, F., Visse, R., Bihan, D., Raynal, N., Farndale, R.W., Murphy, G., Enghild, J.J., Hohenester, E. and Nagase, H.,** 2012, Structural insights into triple-helical collagen cleavage by matrix metalloproteinase 1, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109 (31), 12461-6pp.

**Manosroi, A., Chutoprapat, R., Abe, M., Manosroi, W. and Manosroi, J.,** 2012, Anti-aging efficacy of topical formulations containing niosomes entrapped with rice bran bioactive compounds, *Pharm. Biol.*, 50, 208-224pp.

**Marepally, S., Boakye, C.H., Shah, P.P., Etukala, J.R., Vemuri, A. and Singh, M.,** 2013, Design, synthesis of novel lipids as chemical permeation enhancers and development of nanoparticle system for transdermal drug delivery, *PLoS One*, 8 (12).

**Marshall, D.C., Lyman, S.K., McCauley, S., Kovalenko, M., Spangler, R., Liu, C., Lee, M., O'Sullivan, C., Barry-Hamilton, V., Ghermazien, H., Mikels-Vigdal, A., Garcia, C.A., Jorgensen, B., Velayo, A.C., Wang, R., Adamkewicz, J.I. and Smith, V.,** 2015, Selective allosteric inhibition of mmp9 is efficacious in preclinical models of ulcerative colitis and colorectal cancer, *PLoS One*, 10(5).

**Martins, S., Sarmiento, B., Ferreira, D. C. and Souto, E. B.,** 2007, Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery--liposomes versus lipid nanoparticles, *Int J Nanomedicine*, 2(4), 595-607pp.

**Matrixyl3000,** "https://www.ulprospector.com/en/na/PersonelCare/Detail/1240/420570/Matrixyl-3000", (Erişim tarihi: 20 Temmuz 2018).

**Mende, F. and Seitz, O.,** 2011, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl-based solid-phase synthesis of peptide alpha-thioesters, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 50 (6), 1232-1240pp.

**Miragoli, M., Ceriotti, P., Iafisco, M., Vacchiano, M., Salvarani, N., Alogna, A., Carullo, P., Ramirez-Rodriguez, G. B., Patricio, T., Esposti, L. D.,**

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

**Rossi, F., Ravanetti, F., Pinelli, S., Alinovi, R., Erreni, M., Rossi, S., Condorelli, G., Post, H., Tampieri, A. and Catalucci, D.**, 2018, Inhalation of peptide-loaded nanoparticles improves heart failure, *Sci. Transl. Med.*, 10, 424p.

**Mohammed, A. R., Bramwell, V. W., Coombes, A. G. and Perrie, Y.**, 2006, Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products, *Methods*, 40 (1), 30-38pp.

**Mora Huertas, A.C., Schmelzer, C.E., Hoehenwarter, W., Heyroth, F. and Heinz, A.**, 2016, Molecular-level insights into aging processes of skin elastin, *Biochimie.*, 128-129, 163-73pp.

**Morales, R., Perrier, S., Florent, J. M., Beltra, J., Dufour, S., De Mendez, I., Manceau, P., Tertre, A., Moreau, F., Compere, D., Dublanquet, A. C. and O'Gara, M.**, 2004, Crystal structures of novel non-peptidic, non-zinc chelating inhibitors bound to MMP-12, *J. Mol. Biol.*, 341 (4), 1063-1076pp.

**Mortelmans, K. and Zeiger, E.**, 2000, The Ames salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.*, 455, 1-2, 29-60pp.

**Murphy-Ullrich, J.E. and Poczatek, M.**, 2000, Activation of latent TGF-beta by thrombospondin-1: Mechanisms and physiology, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 11, 59-69pp.

**Naguib, Y. W., Rodriguez, B. L., Li, X., Hursting, S. D., Williams, R. O. and Cui, Z.**, 2014, Solid lipid nanoparticle formulations of docetaxel prepared with high melting point triglycerides: *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Mol Pharm.*, 11, (4), 1239-1249pp.

**National Cancer Institute**, "Anatomy of the skin, showing the epidermis, dermis, and subcutaneous tissue", <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0022669/?figure=1>, (Erişim tarihi: 01 Mayıs 2018).

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Naylor, E.C., Watson, R.E. and Sherratt, M.J.**, 2011, Molecular aspects of skin ageing, *Maturitas*,. 69(3), 249-56pp.

**Ndinguri, M.W., Bhowmick, M., Tokmina-Roszyk, D., Robichaud, T.K. and Fields, G.B.**, 2012. Peptide-based selective inhibitors of matrix metalloproteinase-mediated activities, *Molecules*, 17(12), 14230-48pp.

**Nuti, E., Cuffaro, D., Bernardini, E., Camodeca, C., Panelli, L., Chaves, S., Ciccone, L., Tepshi, L., Vera, L., Orlandini, E., Nencetti, S., Stura, E. A., Santos, M. A., Dive, V. and Rossello, A.**, 2018, Development of thioaryl-based matrix metalloproteinase-12 inhibitors with alternative zinc-binding groups: synthesis, potentiometric, nmr, and crystallographic studies, *J. Med. Chem*, 61, (10), 4421-4435pp.

**Ochiai, A., Tanaka, S., Tanaka, T. and Taniguchi, M.**, 2016, Rice bran protein as a potent source of antimelanogenic peptides with tyrosinase inhibitory activity, *J. Nat. Prod*, 79, 2545–2551pp.

**OECD, 2002.**, Guideline for testing of chemicals, no. 404: acute dermal irritation, corrosion. revised test guideline as adopted 24 april, tg 404, plus annexes, 7 pp.

**OECD Test Guidelines Programme.**, 1996, ENV/MC/CHEM/TG(96), Final report of the oecd workshop on harmonisation of validation and acceptance criteria of alternative toxicological test methods – OECD Publications Office, Paris.

**OECD.**, 2004, Guidelines for the testing of chemicals, No. 431, *In vitro* skin corrosion: Human skin model test, Paris, France, 8 p.

**Onoue, S., Seto, Y., Sato, H., Nishida, H., Hirota, M., Ashikaga, T., Api, A. M., Basketter, D. and Tokura, Y.**, 2017, Chemical photoallergy: photobiochemical mechanisms, classification, and risk assessments, *J Dermatol. Sci*, 85 (1), 4-11pp.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Overall, C. M. and Kleifeld, O.**, 2006, Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy, *Br. J. Cancer*, 94, (7), 941-946pp.

**Padois, K., Cantieni, C., Bertholle, V., Bardel, C., Pirot, F. and Falson, F.**, 2011, Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil, *Int. J. Pharm*, 416, (1), 300-304pp.

**Pai, V.V., Bhandari, P. and Shukla, P.**, 2017, Topical peptides as cosmeceuticals. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 83(1), 9-18pp.

**Park, D. H., Jung, D. H., Kim, S. J., Kim, S. H. and Park, K. M.**, 2014, Galloyl-RGD as a new cosmetic ingredient, *B.M.C Biochem*, 15, 18p.

**Reddy, B., Jow, T. and Hantash, B. M.**, 2012, Bioactive oligopeptides in dermatology, Part I, *Exp Dermatol*, 8, 563-8pp.

**Peptiskin**, 2018, Solabiagroup, <https://www.ulprospector.com/en/na/PersonalCare/Detail/3833/108324/Peptiskin>, (Erişim tarihi: 19,06.2018)

**Pickart, L. and Schagen, S.**, 2015, New data of the cosmeceutical and tripeptide GHK, *SOFW J*, 9, 141pp.

**Pittayapruerk, P. Meephansan, J. Prapapan, O. Komine, M. and Ohtsuki, M.**, 2016, Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis, *Int. J. Mol. Sci*, 17, 6p.

**Puglia, C., Bonina, F., Rizza, L., Blasi, P., Schoubben, A., Perrotta, R., Tarico, M.S. and Damiani, E.**, 2012, Lipid nanoparticles as carrier for octyl-methoxycinnamate: *in vitro* percutaneous absorption and photostability studies, *J. Pharm.Sci.* 101(1), 301-11pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

**Pullar, J. M., Carr, A. C. and Vissers, M. C. M.,** 2017, The roles of vitamin C in skin health, *Nutrients*, 9, (8).

**Puig, A., Antón, J.M. and Mangués, M.,**2008, A new decorin-like tetrapeptide for optimal organization of collagen fibres, *Int. J. Cosmet .Sci*, 30,97-104pp.

**Pure Skin Care,** "How can I increase my collagen". <http://www.pureskinalderley.co.uk/how-can-i-increase-my-collagen/>(Erişim tarihi: 05 Haziran 2018).

**Rabionet, M., Gorgas, K. and Sandhoff, R.,** 2014, Ceramide synthesis in the epidermis, *Biochim. Biophys. Acta*, 1841 (3), 422-434pp.

**Rahnamaeian, M. and Vilcinskas, A.,** 2015, Short antimicrobial peptides as cosmetic ingredients to deter dermatological pathogens, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 99, 8847–8855pp.

**Rahnamaeian, M. and Vilcinskas, A.,** 2015, Short antimicrobial peptides as cosmetic ingredients to deter dermatological pathogens, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 99, 8847–8855p.

**Riddles, P.W.,Blakeley, R.L. and Zerner, B.,**1979, Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)-a reexamination, *Anal Biochem.*, 94(1),75-81pp.

**Rinaldi, A.,** 2008, Healing beauty? More biotechnology cosmetic products that claim drug-like properties reach the market, *EMBO reports*, 1073-1077 pp.

**ROCHE,** “[https://cssportal.roche.com/LFR\\_PublicDocs/ras/11810740001\\_en\\_06.pdf](https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11810740001_en_06.pdf)”, (Erişim tarihi:06 Haziran 2018)

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Sand, J.M., Larsen, L., Hogaboam, C., Martinez, F., Han, M., Røssel Larsen, M., Nawrocki, A., Zheng, Q., Karsdal, M.A. and Leeming, D.J.**, 2013, MMP mediated degradation of type IV collagen alpha 1 and alpha 3 chains reflects basement membrane remodeling in experimental and clinical fibrosis—validation of two novel biomarker assays, *PLoS One*.8(12).

**Sbardella D., Fasciglione G.F., Gioia M., Ciaccio C., Tundo G.R., Marini S. and Coletta M.**, 2012, Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes, *Mol. Asp. Med*, 33,119–208pp.

**SCENIHR**, “Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks, Opinion on The Appropriateness of The Risk Assessment Methodology in Accordance with The Technical Guidance Documents for New and Existing Substances for Assessing The Risks Of Nanomaterials”, [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihhr/docs/scenihhr\\_o\\_010.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_010.pdf), (Erişim tarihi: 06 Haziran 2018).

**Schagen, S.K.**, 2017, Topical Peptide Treatments with Effective Anti-Aging Results, *Cosmetics*,4(2).

**Sethi, K. K., Yannas, I. V., Mudera, V., Eastwood, M., McFarland, C. and Brown, R. A.**, 2002, Evidence for sequential utilization of fibronectin,

vitronectin, and collagen during fibroblast-mediated collagen contraction, *Wound Repair Regen*, 10 (6), 397-408pp.

**Shin, M.H., Rhie, G.E., Park, C.H., Kim, K.H, Cho, K.H, and Eun, H.C.**, 2005, Modulation of collagen metabolism by the topical application of dehydroepiandrosterone to human skin, *J. Invest Dermatol*, 124, 315–23pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Sim, G.S., Lee, D.H., Kim, J.H., An, S.K., Choe, T.B., Kwon, T.J., Pyo, H.B. and Lee, B.C.,** 2007, Black rice (*Oryza sativa L.* var. japonica) hydrolyzed peptides induce expression of hyaluronan synthase 2 gene in HaCaT keratinocytes, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 271–279pp.

**Simberg, D., Weisman, S., Talmon, Y. and Barenholz, Y.,** 2004, DOTAP (and other cationic lipids): chemistry, biophysics, and transfection, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 21, (4), 257-317pp.

**Soares, S., Fonte, P., Costa, A., Andrade, J., Seabra, V., Ferreira, D., Reis, S. and Sarmiento, B.,** 2013, Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 456 (2), 370-381pp.

**Sottile, J. and Hocking, D. C.,** 2002, Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions, *Mol. Biol. Cell.*, 13 (10), 3546-3559pp.

**Souto, E.B. and Müller, R.H.,** 2008, Challenging cosmetics-solid lipid nanoparticles (sln) and nanostructured lipid carriers (nlc), in: wiechers jw, editör, science and application of skin delivery systems, coral stream, *Allured Publ.Co*; 227–250pp.

**Suter, F., Schmid, D., Wandrey, F. and Zulli, F.,** 2016, Heptapeptide-loaded solid lipid nanoparticles for cosmetic anti-aging applications, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 108, 304-309pp.

**Sternlicht, M.D. and Werb, Z .,** 2001, How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17, 463–516pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Taddese, S., Jung, M.C., Ihling, C., Heinz, A., Neubert, R.H. and Schmelzer, C.E.**, 2010, MMP-12 catalytic domain recognizes and cleaves at multiple sites in human skin collagen type I and type III, *Biochimica et Biophysica Acta*, 731–739 pp.

**Taddese. S., Weiss, A.S., Neubert, R.H. and Schmelzer, C.E.**, 2008, Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin, *Matrix Biology*, 27, 420–428pp.

**Tewari, A., Gryb, K., Kollet, J., Sarkany, R. and Young, A. R.**, 2014, Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: potential implications for photoaging, *J. Invest. Dermatol*, 134, (10), 2598-2609pp.

**Toll, R., Jacobi, U., Richter, H., Lademann, J., Schaefer, H. and Blume-Peytavi, U.**, 2004, Penetration profile of microspheres in follicular targeting of terminal hair follicles, *J. Invest. Dermatol.*, 123(1), 168-76pp.

**Towbin, H., Staehelin, T. And Gordon, J.**, 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad Sci.*, 76(9):4350-4pp.

**Tracy, L. E., Minasian, R. A. and Caterson, E. J.**, 2016, Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound, *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 5 (3), 119-136pp.

**Uchida, T., Nishioka, K., Motoki, A., Yakumaru, M., Sano, T., Todo, H. and Sugibayashi, K.**, 2016, Effect of esters on the permeation of chemicals with different polarities through synthetic artificial membranes using a high-throughput diffusion cell array, *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 64 (11), 1597-1606pp.

**Vartanian, A.J. and Dayan, S.H.**, 2004, Facial rejuvenation using botulinum toxin A: a review and updates, *Facial Plast Surg*, 20, 11–19pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Wieber, A., Selzer, T. and Kreuter, J.,** 2012, Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, 80 (2), 358-367pp.

**Wissing, S. A. and Muller, R. H.,** 2001, Solid lipid nanoparticles (SLN)--a novel carrier for UV blockers, *Pharmazie*, 56, (10), 783-786pp.

**Whitehead, T.A., Chevalier, A., Song, Y., Dreyfus, C., Fleishman, S.J., De Mattos, C., Myers, C.A., Kamisetty, H., Blair, P., Wilson, I.A. and Baker, D.,** 2012, Optimization of affinity, specificity and function of designed influenza inhibitors using deep sequencing, *Nat Biotechnol.*, 30(6), 543-8pp.

**Wong, C. Y., Al-Salami, H. and Dass, C. R.,** 2018, The role of chitosan on oral delivery of peptide-loaded nanoparticle formulation, *J. Drug Target*, 26(7), 551-562pp.

**Wu, L., Tanimoto, A., Murata, Y., Sasaguri, T., Fan, J., Sasaguri, Y. and Watanabe T.,** 2003, Matrix metalloproteinase-12 gene expression in human vascular smooth muscle cells, *Genes Cells*, 8, 225-234pp.

**Xia, Q., Saupe, A., Müller, R.H. and Souto, E.B.,** 2007, Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 29(6), 473-82pp.

**Xu, L., Wempe, M. F. and Anchordoquy, T. J.,** 2011, The effect of cholesterol domains on PEGylated liposomal gene delivery *in vitro*, *Ther. Deliv*, 2(4), 451-460pp.

**Van Doren, S. R.,** 2015, Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin, *Matrix Biol*, 44-46, 224-231pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Yadav, L., Puri, N., Rastogi, V., Satpute, P., Ahmad, R. and Kaur, G.,** 2014, Matrix metalloproteinases and cancer – roles in threat and therapy, *Asian Pac. J. Cancer Prev*, 15,1085–91pp.

**Youssef, T., Fadel, M., Fahmy, R. and Kassab, K.,** 2012, Evaluation of hypericin-loaded solid lipid nanoparticles: physicochemical properties, photostability and phototoxicity, *Pharm Dev. Technol*, 17 (2),177-186pp.

**Yu, B., Zhu, J., Xue, W., Wu, Y., Huang, X., Lee, L. J. and Lee, R. J.,** 2011, Microfluidic assembly of lipid-based oligonucleotide nanoparticles, *Anticancer Res*, 31 (3), 771-776pp.

**Yu H., Lee, L.J. and Lee, R.J.,** 2011, Microfluidic assembly of lipid- based oligonucleotidenanoparticles, *Anticancer Res.*,771-6pp.

**Zhang, S. and Duan, E.,** 2018, Fighting against skin aging: the way from bench to bedside, *Cell Transplant*, 27 (5),729-38pp.

**Zhang, S., Qiu, Y. and Gao, Y.,** 2014, Enhanced delivery of hydrophilic peptides *in vitro* by transdermal microneedle pretreatment, *Acta Pharm. Sin B*, 4 (1) 100-104pp.

**Zhang Z., Zhu S., Yang Y., Ma X. and Guo S.,**2015, Matrix metalloproteinase-12 expression is increased in cutaneous melanoma and associated with tumor aggressiveness, *Tumor Biol*, 36, 8593–8600pp.

**Zhigaltsev, I.V., Belliveau, N.,Hafez, I.,Leung, A.K.,Huft, J.,Hansen, C. And Cullis, P.R.,** 2012, Bottom-up design and synthesis of limit size lipid nanoparticle systems with aqueous and triglyceride cores using millisecond microfluidic mixing, *Langmuir*, 28, 3633–3640pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Zhou, B.R., Ma, L.W., Liu, J., Zhang, J.A., Xu, Y., Wu, D., Permatasari, F. and Luo, D.,** 2016, Protective effects of soy oligopeptides in ultraviolet b-induced acute photodamage of human skin, *Oxid. Med. Cell. Longev.*





## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

**Adı- Soyadı:** OĞUZ ÖZTÜRK

**Doğum yeri ve tarihi:** ANTALYA – 10.03.1976

**İletişim adresi ve telefonu:** Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi  
Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Konyaaltı – ANTALYA

**Tel:** 0505 6091410

### II – Eğitim

**Doktora:** Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji, 2013 – 2018.

**Yüksek Lisans:** Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya  
A.B.D, 2000-2003

**Lisans:** İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 1995-1999.

### III – Mesleki Deneyim

Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü,  
Öğretim Görevlisi, 2011 – devam.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyolog, 2004-2011.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya A.B.D araştırma görevlisi, 2000-  
2003

### IV – Bilimsel Faaliyetler

#### SCI, SSCI ve AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- 1- Sahin E, Gumuslu S, **Ozturk O**, et al. Marked changes in erythrocyte antioxidants and lipid peroxidation levels of rats exposed to acute, repeated and chronic restraint stress. PHARMAZIE Volume: 59 Issue: 12 Pages: 961-964,2004.
- 2- **Ozturk O**, Gumuslu S . Age-related changes of antioxidant enzyme activities, glutathione status and lipid peroxidation in rat erythrocytes after heat stress LIFE SCIENCES Volume: 75 Issue: 13 Pages: 1551-1565,2004

- 3- Ozturk O**, Gumuslu S .Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, copper, zincsuperoxide dismutase and catalase activities, glutathione and its metabolizing enzymes,and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. EXPERIMENTAL GERONTOLOGY Volume: 39 Issue: 2 Pages: 211-216 Published: FEB 2004.
- 4- Abidin I, Yargiçoğlu P, Agar A, Gümüslü S, Aydın S, **Ozturk O**, Sahin E. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. Int J Neurosci. 2004 May;114(5):683-99.

**Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

- 1-Gumuslu S, **Ozturk O**. Changes in antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes with age . Conference Information: IUBMB 50th Anniversary Symposium, JUL 02-07, 2005 Budapest, HUNGARYSource: FEBS JOURNAL Volume: 272 Pages: 548-549.
- 2-**Ozturk O**, Gumuslu S, Sahin E, et al .Effects of single and repeated restraint stress on erythrocyte antioxidant enzymes and lipid peroxidation in rats . Source: FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE Volume: 33 Pages: S16-S16.
- 3- Sahin E, Gumuslu S, **Ozturk O**, et al.The effects of chronic restraint stress on erythrocyte antioxidant status and lipid peroxidation. Source: FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE Volume: 33 Pages: S17-S17.
- 4- Gümüslü S., **Ozturk O**.: Effects of immobilization stress and vitamin E on plasma antioxidants in plasma of rats. EUROMEDLAB 2001. 14th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 5th Czech National Congress of Clinical Biochemistry. May 26-31,2001, Prague, Czech Republic. Abstracts Volume, p.115 (PO-B015).
- 5- **Ozturk O**., Gümüslü S., Şahin E., Abidin İ., Yargiçoğlu P., Açar A.: Effects of single and repeated restraint stress on erythrocyte antioxidant enzymes and lipid peroxidation in rats. XIth Meeting of the Society for Free Radical

Research International, July 16-20, 2002, Paris, France. Free Radical Biology & Medicine, 33: S1 (S16), 2002.

6-Şahin E., Gümüşlü S., **Ozturk, O.**, Abidin İ., Yargıçoğlu P., Açar A.: The effects of chronic restraint stress on erythrocyte antioxidant status and lipid peroxidation. XIth Meeting of the Society for Free Radical Research International, July 16-20, 2002, Paris, France. Free Radical Biology & Medicine, 33: S1 (S17), 2002.

7- Gümüşlü S., **Ozturk, O.**, Age-dependent changes of antioxidant enzymes, glutathione and marker of free radical damage in rat erythrocytes. Frontiers in neurodegenerative disorders and aging: fundamental aspects, clinical perspectives and new insights. NATO Advanced Research Workshop, May 26 – June 1, 2003, Antalya, Turkey.

#### **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler**

1-Biyoteknoloji ve Kozmetik ürünler. Kozmetik kongresi 21-24 Şubat 2016. Antalya

2-Kombinatoriyal Biyosentez. Ulusal Botanik Kongresi. 25-28 Ekim 2014. Antalya. Sözlü

#### **Ulusal ve Uluslararası Desteklenen Projeler**

1-Dorystoechas Hastata Bitkisinin toksikolojik ve anti-aging özelliklerinin incelenmesi, klasik ve doku kültürü yöntemiyle çoğaltılması. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Ar-ge Destek Programı. Proje Yürütücüsü. Proje No: TAGEM14/ ARGE 41,2014

2-Anti aging amaçlı siRNA ve peptit içeren lipid partiküllerin üretilmesi. KOSGEB-Ar-Ge, İnovasyon ve Endüstriyel Uygulama Destek Programı. Proje Yürütücüsü,2015

3-TRUMAP-Networking and Dialogue on Black Truffles and Medicinal & Aromatic Plants in Turkey and Spain. EuropeAid EU. Proje Partneri, 2016

## **EKLER**

**Ek 1** Dermatolojik Test (Patch) Analizi

**Ek 2** Cilt Elastikiyet ve Cilt Kırışıklık Test (Anti Wrinkle) Analizleri



## Ek 1 Dermatolojik Test (Patch) Analizi



Specialized Research Laboratory

Department of application and implementation  
research for cosmetics and chemical industries  
and specialized research for light industry

Cracow, 27<sup>th</sup> July, 2018  
Copy 1 of 1

### REPORT FROM DERMATOLOGICAL RESEARCH (PATCH TEST)

Test number:

13/06/18/D/1

#### CELLULAR REMODELING SERUM

name and address of the Principal:

**OGUZ ÖZTÜRK/ MORLAB BIOTECHNOLOGY  
ANTALYA TEKNOPOLIS ULUGBEY BUILDING NO 36 ANTALYA TURKEY**

We confirm the quality, efficacy and safety

## **1. BASIS OF TEST IMPLEMENTATION**

- Order received on June 27<sup>th</sup>, 2018 with the assigned number 13/06/18/A/1
- Samples of the product delivered by the Principal
- Series: DER310518
- Date of the production: 31.05.2018
- Confirmation of positive results of microbiological research – attached by the Principal
- Quality composition of the product provided by the Principal:

*INCI: Aqua,, Sodium Acrylates Copolymer, Lecithin , Heptapeptide 76( in application) , Ceramid NS, Cholesterol, egg Lesitin, PEG 2000, Dioleoyl PG-Trimonium Chloride, Mannitol, Phenoxyethanol, Caprylyl glycol*

## **2. PRODUCT DESCRIPTION**

- PACKAGING: plastic packaging with an information label
- APPEARANCE: a transparent mixture of cosmetic raw materials
- FRAGRANCE: compatible with the raw materials used

## **3. PRODUCT USE**

The product is intended for face skin care.

## **4. PURPOSE OF THE RESEARCH**

Dermatological safety assessment of the product – evaluation of the potential irritant and sensitizing properties.

## **5. LEGAL BASE OF THE RESEARCH:**

- Regulation of the European Parliament and Council Regulation (EC) No 1223/2009 of November 30, 2009, relating to cosmetic products.
- Cosmetics Europe- The Personal Care Association Guidelines „Product test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997“
- WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (1964r. and later changes)

## **6. PROBAND SELECTION**

Probands taking part in the study were selected on the bases of:

- The current Polish and European law
- COLIPA Guidelines
- Declaration of Helsinki (1964) *(with later additions)*

25 women, aged 18 – 62 years were selected for the dermatological tests of the product. All of the probands selected for testing met the requirements for inclusion in the study, signed an agreement to participate in the study and were informed about: the purpose of the study, how it is carried out and what are the possible side effects. During the tests all the probands were under constant dermatological care.

## 7. METHODS AND DESCRIPTION OF RESEARCH

Dermatological tests were performed in accordance with the COLIPA Guideless for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997". Test has been conducted on group of 15 individuals using Jadassohn-Bloch model (with Rudzki modifications). Reading the tests and results registration has been done in accordance with the recommendations of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG).

Standard IQ chambers were used for patch testing. A small amount of product was applied to patients forearm for 48 hours and then removed. Baseline readings were recorded 30 minutes after removal of product from skin. Additional readings were performed after 72, 96 hours and one week after test application for product to show delayed reactions. Readings evaluation was done according to graphic scale which was consistent with generally accepted clinical dermatological scale.

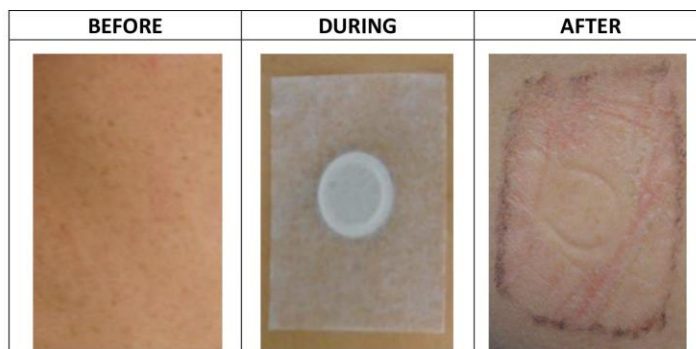
## 8. DURATION OF RESEARCH

All the tests and analysis of their results were conducted from June 13th, 2018 to July 27th, 2018. Tests were completed by all enrolled people.

## RESULTS

No.	Identification number	Sex	Age	Test result			
				48 h	72 h	96 h	one week
1	13/06/18/D/1-1	F	22	(-)	(-)	(-)	(-)
2	13/06/18/D/1-2	F	25	(-)	(-)	(-)	(-)
3	13/06/18/D/1-3	F	24	(-)	(-)	(-)	(-)
4	13/06/18/D/1-4	F	26	(-)	(-)	(-)	(-)
5	13/06/18/D/1-5	F	25	(-)	(-)	(-)	(-)
6	13/06/18/D/1-6	F	41	(-)	(-)	(-)	(-)
7	13/06/18/D/1-7	F	25	(-)	(-)	(-)	(-)
8	13/06/18/D/1-8	F	30	(-)	(-)	(-)	(-)
9	13/06/18/D/1-9	F	54	(-)	(-)	(-)	(-)
10	13/06/18/D/1-10	F	61	(-)	(-)	(-)	(-)
11	13/06/18/D/1-11	F	22	(-)	(-)	(-)	(-)
12	13/06/18/D/1-12	F	24	(-)	(-)	(-)	(-)
13	13/06/18/D/1-13	F	25	(-)	(-)	(-)	(-)
14	13/06/18/D/1-14	F	62	(-)	(-)	(-)	(-)
15	13/06/18/D/1-15	F	23	(-)	(-)	(-)	(-)
16	13/06/18/D/1-16	F	43	(-)	(-)	(-)	(-)
17	13/06/18/D/1-17	F	55	(-)	(-)	(-)	(-)
18	13/06/18/D/1-18	F	23	(-)	(-)	(-)	(-)
19	13/06/18/D/1-19	F	37	(-)	(-)	(-)	(-)
20	13/06/18/D/1-20	F	18	(-)	(-)	(-)	(-)
21	13/06/18/D/1-21	F	27	(-)	(-)	(-)	(-)
22	13/06/18/D/1-22	F	41	(-)	(-)	(-)	(-)
23	13/06/18/D/1-23	F	30	(-)	(-)	(-)	(-)
24	13/06/18/D/1-24	F	55	(-)	(-)	(-)	(-)
25	13/06/18/D/1-25	F	32	(-)	(-)	(-)	(-)

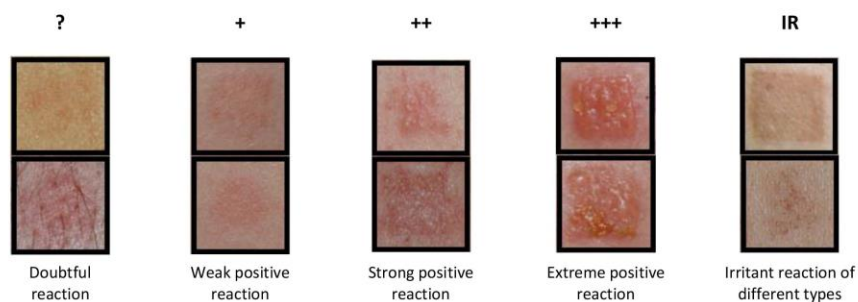
F – female  
M – male



**INTERPRETATION OF PATCH TEST**

Reading the test and writing their results have been done in accordance with the recommendations of the International Contact Dermatitis Research Group (ICDRG).

Record	Diagnosis	Interpretation
-	Negative reaction	No skin lesions
?	Doubtful reaction	Faint erythema only
+	Weak positive reaction	Palpable erythema, infiltration, possibly papules
++	Strong positive reaction	Erythema, infiltration, papules, vesicles
+++	Extreme positive reaction	Intense erythema, infiltration and coalescing vesicles , bullous or ulcerative reaction
IR	Irritant reaction of different types	Discrete patchy erythema without infiltration.





**CONCLUSION:**

**Tested product**

**CELLULAR REMODELING SERUM**

does not exhibit any allergic or/and irritating properties.

Published opinion does not concern people who are allergic  
to ingredients of the tested product.

SKIN LAB INTERNATIONAL Sp. z o.o.  
mgr inż. Magdalena Kędziora  
*Magdalena Kędziora*  
Technolog - Specjalista  
ds. produktów kosmetycznych

*Signature of the person responsible  
for the report*

*lek. med. Barbara Wnuk*  
SPECJALISTA DERMATOLOG  
(WENEROLOG  
K.P. 2562935

*Signature of the person responsible  
for dermatological evaluation*

SKIN LAB INTERNATIONAL Sp. z o.o.  
ul. Zacisze 6, 7, 3, 4, 50 Kraków  
NIP 6762487570, REGON 141856496  
*Lidia Kasperwan-Ojtanowska*  
Dyrektor Laboratorium

*Signature of the  
approving person*

Copy 1 (the Principal)  
Copy of the copy 1 (Skin Lab INTERNATIONAL Ltd.)

## Ek 2 Cilt Elastikiyet ve Cilt Kırışıklık Test (Anti Wrinkle) Analizleri



Specialized Research Laboratory  
Department of application and implementation  
research for cosmetics and chemical industries  
and specialized research for light industry

Cracow, 27<sup>th</sup> July, 2018  
Copy 1 of 1

### REPORT FROM THE APPLICATION RESEARCH

Test number:

13/06/18/A/1

### CELLULAR REMODELING SERUM

name and address of the Principal:

OGUZ ÖZTÜRK/ MORLAB BIOTECHNOLOGY  
ANTALYA TEKNOPOLIS ULUGBEY BUILDING NO 36 ANTALYA TURKEY

We confirm the quality, efficacy and safety

Skin Lab INTERNATIONAL Sp. z o.o.  
Zacisze 6/7, 31-156 Cracow  
mobile: +48 797 700 986  
web: [www.skinlab.pl](http://www.skinlab.pl)  
e-mail: [biuro@skinlab.pl](mailto:biuro@skinlab.pl)

NIP: 676-248-75-70  
REGON: 361356496

## **1. BASIS OF TEST IMPLEMENTATION**

- Order received on June 27<sup>th</sup>, 2018 with the assigned number 13/06/18/A/1
- Samples of the product delivered by the Principal
- Series: DER310518
- Date of the production: 31.05.2018
- Confirmation of positive results of microbiological research – attached by the Principal
- Confirmation of positive results of dermatological research
- Quality composition of the product provided by the Principal:

*INCI: Aqua,, Sodium Acrylates Copolymer, Lecithin , Heptapeptide 76( in application) , Ceramid NS, Cholesterol, egg Lesitin, PEG 2000, Dioleoyl PG-Trimonium Chloride, Mannitol, Phenoxyethanol, Caprylyl glycol*

## **2. PRODUCT DESCRIPTION**

- PACKAGING: plastic packaging with an information label
- APPEARANCE: a transparent mixture of cosmetic raw materials
- FRAGRANCE: compatible with the raw materials used

## **3. PRODUCT USE**

The product is intended for face skin care.

## **4. STUDY TYPE**

- improvement of elasticity
- reduces wrinkles

## **5. PURPOSE OF THE RESEARCH**

Confirmation of declared product functions and evaluation of its application properties.

## **6. LEGAL BASE OF THE RESEARCH:**

- Regulation of the European Parliament and Council Regulation (EC) No 1223/2009 of November 30, 2009, relating to cosmetic products.
- Cosmetics Europe- The Personal Care Association (former COLIPA) Guidelines „Product test Guidelines for the Assessment of Human Skin Compatibility 1997”
- Cosmetics Europe- The Personal Care Association (former COLIPA) „Guidelines for the Evaluation of the Efficacy of Cosmetic Products 2008”
- WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (1964r. and later changes).

## **7. PROBAND SELECTION**

Probands taking part in the study were selected on the bases of:

- The current Polish and European law
- COLIPA Guidelines
- Declaration of Helsinki (1964) *(with later additions)*

10 women aged 30 – 68 years were selected for the application tests of the product. All of the probands selected for testing met the requirements for inclusion in the study, signed an agreement to participate in the study and were informed about:

the purpose of the study, how it is carried out and what are the possible side effects. During the tests all the probands were under constant dermatologist care.

## **8. METHODOLOGY**

### **APPLICATION TEST:**

Probands have received product and earlier prepared questionnaire. Test lasted for 4 weeks.

#### **All probands were obliged to:**

- use product for 4 weeks
- not use any products with similar function
- urgently stop using product if any unwanted side effects occurred and immediately report to dermatologist
- observe and note down all the observation in questionnaire

### **APPARATUS TEST:**

The apparatus test was carried out using the DermaLab Combo / ASW 300 measuring device, in accordance with the procedures in force at the laboratory.

The measurements were made on the skin of 10 candidates selected by the dermatologist: before applying the product and after 4 weeks of regular application.

#### **Measured parameters:**

- elasticity
- wrinkles analysis

## **9. DURATION OF RESEARCH**

All the tests and analysis of their results were conducted from June 28<sup>th</sup> to July 27<sup>th</sup>, 2018. Tests were completed by all enrolled people.

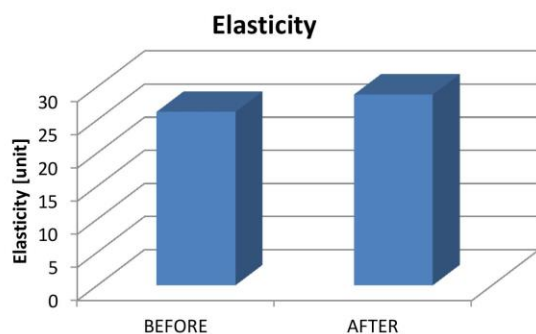
## RESULTS

### APARATUS TEST:

## CELLULAR REMODELING SERUM

### 1. ELASTICITY

MEASUREMENT	AVERAGE ELASTICITY VALUE	RECEIVED RESULT
BEFORE	26,2 unit	<b>+ 9,92%</b>
AFTER 4 WEEKS APPLICATION	28,8 unit	



The test was performed using an ASW 300 (Aram Huvis) device. The measurements were taken on the group of 10 volunteers: before and 4 week application.

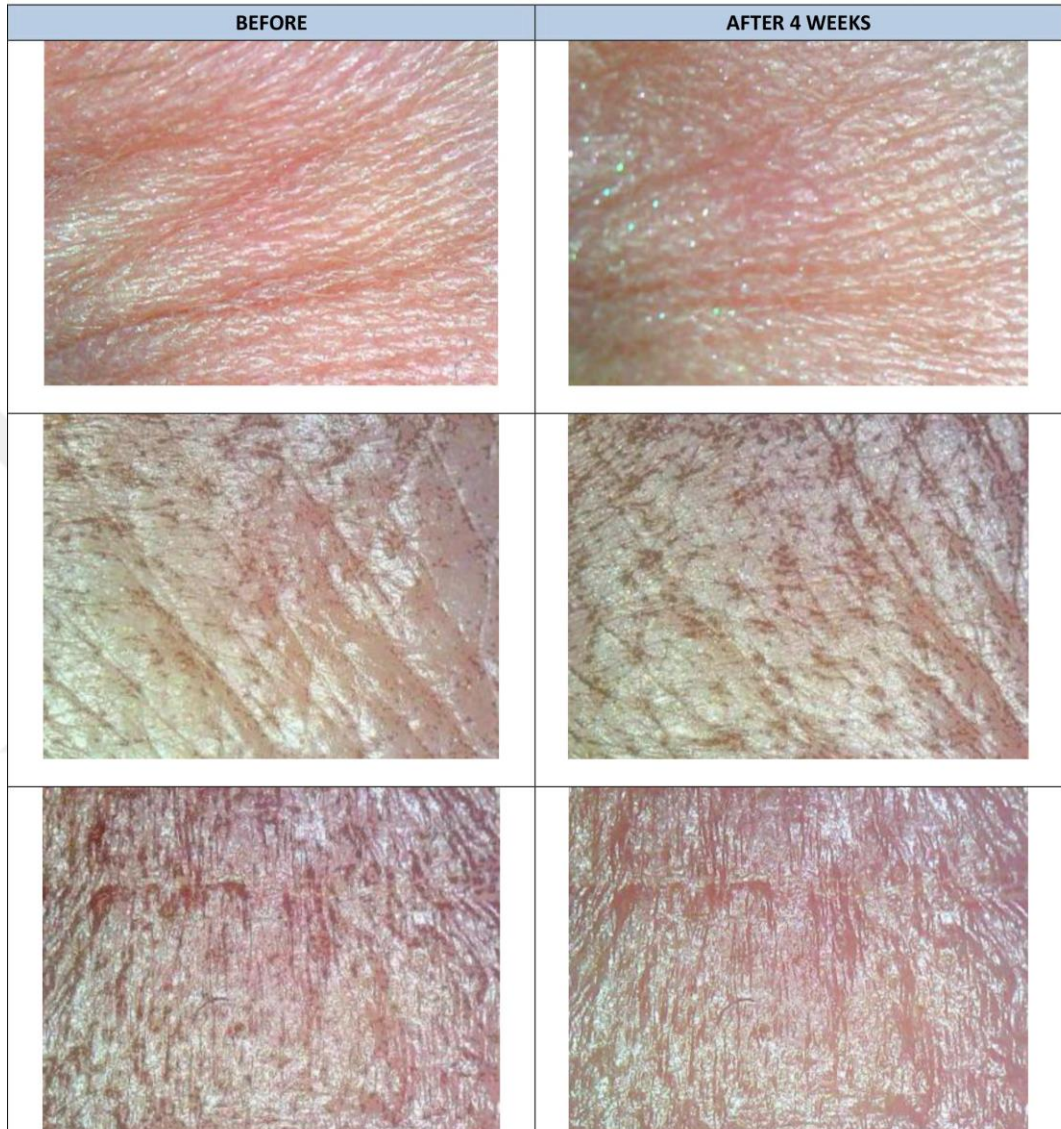
The elasticity values received from the 10 volunteers, after the calculation, indicate the final average for the measurements taken before and after 4 week application.

### INTERPRETACJA WYNIKÓW:

Average elasticity value before product application:	<b>26,2 unit</b>
Average elasticity value after 4 week application:	<b>28,8 unit</b>
Result:	<b>+ 9,92%</b>
Interpretation:	<b>increase</b>
Evaluation:	<b>positive</b>

## 2. WRINKLES

MEASUREMENT	AVERAGE WRINKLES VALUE	RESEIVED RESULT
BEFORE	60 unit	<b>-18,17 %</b>
AFTER 4 WEEKS APPLICATION	49,1 unit	



The test was performed using an ASW 300 (Aram Huvis) device. The wrinkles value was measured by stray light. The measurements were taken on the group of 10 volunteers: before and 4 week application. Skin pictures were taken on group of 3 volunteers.

The wrinkles values received from the 10 volunteers, after the calculation, indicate the final average for the measurements taken before and after 4 week application.

**INTERPRETACJA WYNIKÓW:**

Average wrinkles value before product application:	<b>60 unit</b>	
Average wrinkles value after 4 week application:	<b>49,1 unit</b>	
Result:	<b>-18,17 %</b>	
Interpretation:	<b>decrease</b>	
Evaluation:	<b>positive</b>	

INTERPRETATION

Declarations for the product:

CELLULAR REMODELING SERUM

were confirmed.

SKIN LAB INTERNATIONAL Sp. z s.o.  
ul. Zacisze 6/7, 31-156 Kraków  
NIP 6762487570, REGON 141356496  
*[Signature]*  
mgr Sylwia Pećka  
Specjalista ds. Jakości Produktu  
Signature of the person responsible for the report

Copy 1 (the Principal)  
Copy of the copy 1 (Skin Lab INTERNATIONAL Ltd.)

lek. med. Barbara Wnuk  
SPECIALISTA DERMATOLOG  
EWENTUOLOG  
KR 536.29.25  
*[Signature]*  
Signature of the person responsible  
for dermatological evaluation

SKIN LAB INTERNATIONAL Sp. z o.o.  
ul. Zacisze 6/7, 31-156 Kraków  
NIP 6762487570, REGON 141356496  
*[Signature]*  
Lidia Kopycinska-Szuchowiczka  
Dyrektor Laboratorium  
Signature of the  
operating person