

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

***Spirulina platensis* KATKILI CİLT KREMLERİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNDE  
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**Suna Seda GÜNEŞ**

**Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 612.01.00**

**Sunuş Tarihi: 17.06.2009**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY**

**Bornova-İZMİR**



S.Seda GÜNEŞ tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “*Spirulina platensis* Katkılı Cilt Kremlerinin Geliştirilmesi ve Hücre Kültürleri Üzerinde Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 17/06/2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Meltem CONK DALAY** .....

**Raportör Üye : Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN** .....

**Üye : Prof. Dr. Atakan SUKATAR** .....



## ÖZET

### ***Spirulina platensis* KATKILI CİLT KREMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNDE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**GÜNEŞ, Suna Seda**

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Haziran 2009, 96 sayfa

Bu çalışmada, cilt kremi olarak geliştirilecek *Spirulina platensis* ham ekstrakt katkılı cilt kremlerinin hücre kültürleri üzerinde *in vitro* olarak sitotoksik, genotoksik ve yara iyileşmesi çalışmaları yapılmıştır.

Mikroalgler ve mavi-yeşil algler, çok eski yıllardan beri terapötik amaçlı kullanılmaktadır. Mikroalgler, yararlı terapötik ajan, etken madde olarak kullanılacak biyolojik aktiviteye sahip birçok yeni bileşiğin önemli üreticilerindendir. *Spirulina*, *Chlorella* gibi mikroalgler, protein, karbonhidrat, gama linolenik asit, yağ asidi, karotenoidler, vitamin B1 ve B2 gibi birçok biyoaktif bileşeni bünyesinde barındırmaktadır. Ayrıca bazı mikroalgler, içerdikleri omega-3 ve omega-6 yağ asitleri, karotenoidler, tokoferol, fikosiyenin ve fenolik bileşikler nedeniyle antioksidan özellik göstermektedir. Bunlara bağlı olarak birçok mikroalg ve mavi-yeşil alg farmasötik özellikleri ve olumlu etkileri nedeniyle

kozmetik sektöründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroalgal ve siyanobakteriyel ekstraktlar cilt bakım ürünlerinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada *Spirulina platensis*'in laboratuvar koşullarında kontrollü olarak üretimi sağlandıktan sonra ham ekstraktı elde edilmiştir. Krem formulasyonuna ilave edilecek olan optimum ham ekstrakt oranını bulmak için farklı ham ekstrakt oranlarıyla bir seri ön deneme yapılmıştır. Daha sonra belirlenen farklı oranlar geliştirilen cilt kreminin formulasyonuna ilave edilmiş ve *in vitro* sitotoksisite, genotoksisite ve yara iyileşmesi testleri yapılmıştır.

*In vitro* koşullarda hem sitotoksisite, proliferasyon ve yara iyileşmesi hem de genotoksisite denemelerinde en iyi sonuç, % 1.125 oranında *Spirulina platensis* ham ekstrakt içeren kremde elde edilmiştir.

Anahtar sözcükler: *Spirulina platensis*, kozmetik, fikosiyenin, sitotoksisite, genotoksisite

**ABSTRACT****DEVELOPMENT OF SKIN CREAMS INCLUDING *Spirulina platensis* EXTRACTS AND INVESTIGATION OF THEIR EFFECTS ON *IN VITRO* CELL CULTURE****GÜNEŞ, Suna Seda**

MSc in Bioengineering Department

Supervisor: Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

June 2009, 96 pages

In this study, *in vitro* cytotoxic, wound healing and genotoxic investigations of skin creams including *Spirulina platensis* crude extract on animal cell culture were performed.

Microalgae have been used for a long time due to their therapeutic value. Microalgae are important producers of new compounds which have biological activity for using as therapeutic agent. Microalgae such as *Spirulina*, *Chlorella* contain many bioactive ingredients such as proteins, carbohydrates, carotenoids, vitamins, gamma linolenic acids. Additionally some of them have antioxidant properties due to omega-3 and omega-6 fatty acids, carotenoids, tocopherol, phycocyanin and phenolic compounds. Thus, many microalgae have pharmaceutical properties and positive effects on skin are used in cosmetic industry. Microalgal and cyanobacterial extracts are mainly used in skin-care products.

After production of *Spirulina platensis* in controlled laboratory conditions, crude extracts of *Spirulina platensis* were obtained. Different crude extract dilutions were studied to determine the optimum crude extract ratio will be added in cream formulation. These optimum dilutions were added to skin cream formulation and cytotoxicity, wound healing and genotoxicity studies were carried out.

In *in vitro* conditions the best result was obtained in skin cream including % 1.125 *Spirulina platensis* crude extract either cytotoxicity, proliferation and wound healing or genotoxicity assays.

**Key words:** *Spirulina platensis*, cosmetics, phycocyanin, cytotoxicity, genotoxicity



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen ve çalışmalarımın her aşamasında beni yönlendirip fikir ve tecrübelerini aktaran değerli hocam Sayın Prof. Dr. Meltem CONK DALAY'a, yine çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve fikirleriyle bana yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN'a, istatistiki değerlendirmelerim sırasında yol gösteren hocam Doç. Dr. Nuri AZBAR, Tuba KESKİN ve örneklerimin immunhistokimya değerlendirmelerini gerçekleştiren Doç. Dr. Seda VATANSEVER'e teşekkürlerimi sunarım. "000189.STZ.2007-2" nolu San-Tez projesi ile tezimi hayata geçirmemi sağlayan, destek ve katkılarından dolayı T.C. Sanayi Bakanlığı ve DALAN KİMYA A.Ş.'ye teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvarında beraber çalıştığım sevgili arkadaşım Sedef TAMBURACI'ya teşekkür ederim. Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndaki denemelerim sırasında birlikte çalıştığım ve destek aldığım arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve tez çalışmalarım sırasında bana her türlü manevi desteği veren Çağlar ERCAN, Ahenk ELBİRLER ve Seden GÜNEŞ'e teşekkür ederim. Şu an yanımızda olmasa da hayatımda her zaman ayrı bir yeri olan teyzemin manevi anısına da saygılarımı sunarım. Ve tabi ki beni bugünlere getiren, maddi ve manevi her yönden bana hayatım boyunca destek olan, benden ilgi, sevgi, şefkat ve hoşgörülerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme teşekkür ederim.

İyiki varsınız....



**İÇİNDEKİLER****SAYFA**

<b>ÖZET.....</b>	<b>V</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ .....</b>	<b>XIV</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>	<b>XVII</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ.....</b>	<b>XIX</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>3</b>
2.1. Mikroalglerin Kullanım Alanları .....	3
2.1.1. <i>Spirulina</i> 'nın kullanımı .....	11
2.2. Mikroalglerin Kozmetikte Kullanımı.....	15

2.2.1. Kozmetikte etkili olan doğal etken maddeler .....	19
2.2.2. <i>Spirulina</i> 'nın antioksidan aktivitesi ve kozmetikte kullanımı .....	26
2.3. <i>In Vitro</i> Sitotoksisite ve Genotoksisite Testleri .....	33
2.3.1. <i>In vitro</i> sitotoksisite testleri.....	35
2.3.2. <i>In vitro</i> genotoksisite testleri.....	38
2.3.3. <i>In vitro</i> yara iyileşmesi .....	41
<b>3. MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>45</b>
3.1. Materyal .....	45
3.1.1. Organizmalar .....	45
3.1.2. Kullanılan kimyasallar .....	45
3.1.3. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar .....	48
3.2. Metot.....	48
3.2.1. <i>Spirulina platensis</i> 'in inokulasyonu ve takibi .....	48
3.2.2. Protein analizi ve fikosiyanın tayini .....	51
3.2.3. Ham ekstrakt dilüsyonlarının hazırlanması ve krem ekstraksiyonu .....	53
3.2.4. <i>In vitro</i> sitotoksisite testi-MTT .....	55
3.2.5. <i>In vitro</i> yara iyileşmesi .....	58
3.2.6. Mikronukleus analizi .....	61
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>64</b>
4.1. <i>Spirulina platensis</i> Büyüme Eğrisi .....	64
4.2. Protein Miktarı ve Fikosiyanın İçeriği.....	66
4.3. <i>In Vitro</i> Sitotoksisite Testleri-MTT .....	69
4.3.2. Cilt Kremleri MTT Sonuçları .....	74

4.4. <i>In Vitro</i> Yara İyileşmesi Testi .....	75
4.5. <i>In Vitro</i> Genotoksisite Testleri - Mikronukleus Sonuçları .....	84
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>87</b>
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ .....</b>	<b>89</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>96</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
Şekil 2.1. Mavi-yeşil alglerden elde edilen değerli kimyasal ve biyoaktif maddeler.....	6
Şekil 2.2. Mavi-yeşil alglerden elde edilen bileşiklerin biyolojik aktiviteleri.....	7
Şekil 2.3. <i>Spirulina platensis</i> 'in mikroskopik görüntüsü.....	12
Şekil 2.4. <i>Spirulina platensis</i> 'in mikroskopik görüntüsü.(2).....	17
Şekil 2.5. Süperoksit radikallerinin oluşumu.....	26
Şekil 2.6. Süperoksit dismutazın etkisi.....	26
Şekil 2.7. 96 gözlü pleytlerde MTT testi ve formazan oluşumu.....	38
Şekil 2.8. Metafaz plağında mikronukleuslar.....	40
Şekil 2.9. Mikronukleus oluşumu ve analizi.....	41
Şekil 2.10. <i>In vitro</i> yara iyileşmesinin şematik görünümü.....	42
Şekil 3.1. Üretimde kullanılan 2L'lik kültür şişeleri.....	48
Şekil 3.2. <i>Spirulina platensis</i> 'in kültür şişelerinde havalandırılmalı üretimi.....	49
Şekil 3.3. 48 saatlik HS2 hücre hattının 25 cm <sup>2</sup> flasttaki görüntüsü.....	55
Şekil 3.4. 24 gözlü pleyte uygun hücre kültürü <i>insert</i> leri.....	56

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
Şekil 3.5. <i>Insertler</i> ile cilt kremi sitotoksisite denemesi.....	56
Şekil 3.6. Yara oluşturma aparatı ve 24 gözlü pleytte yaraların açılması aşaması.....	59
Şekil 4.1. <i>Spirulina platensis</i> 'in 15 günlük üretim sonucunda elde edilen büyüme eğrisi.....	65
Şekil 4.2. <i>Spirulina platensis</i> 'in 15 günlük üretim sırasında kültürdeki mikroskopik görüntüsü (x200).....	66
Şekil 4.3. Modifiye Lowry Standart Grafiği.....	67
Şekil 4.4. HS <sub>2</sub> keratinosit hücrelerinin farklı ham ekstrakt oranlarıyla muamelesi sonucu morfolojik görünüm.....	70
Şekil 4.5. HS <sub>2</sub> keratinosit hücre hattı ile 1, 3 ve 7 gün sürelerle inkube edilen ekstraktların MTT sonuçları.....	72
Şekil 4.6. HS <sub>2</sub> keratinosit hücre hattı ile 1,3 ve 7 gün sürelerle inkube edilen ekstraktların MTT sonuçlarına göre %canlılık oranları.....	72
Şekil 4.7. %0.50 oranında <i>Spirulina</i> ham ekstrakt içeren cilt kreminin HS <sub>2</sub> keratinosit hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	74
Şekil 4.8. 7.gün sonunda a.Hücre kontrol, b.Krem kontrol, c., d.%0.50 ham ekstrakt içeren cilt kremi-açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri.....	76

## ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
<b>Şekil 4.9.</b> 14.gün sonunda a.Hücre kontrol, b.Krem kontrol, c., d.%0.50 ham ekstrakt içeren cilt kremi-açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri.....	76
<b>Şekil 4.10.</b> 7.günde a.Hücre kontrol, b.Krem kontrol, c.%0.50, d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kremi yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri.....	77
<b>Şekil 4.11.</b> 14.günde a.Hücre kontrol, b.Krem kontrol, c.%0.50, d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kremi-açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri.....	78
<b>Şekil 4.12.</b> 5.günde a.Hücre kontrol, b.Krem kontrol, c.%0.50, d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kremi-açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri.....	79
<b>Şekil 4.13.</b> Yara iyileşmesi testinin 10.gününde a.Hücre kontrol, b.Krem kontrol, c.%0.50, d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kremi-açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri.....	81
<b>Şekil 4.14.</b> Immunhistokimya sonuçları.....	83
<b>Şekil 4.15.</b> Metafaz plağında görülen mikronukleuslar.....	84
<b>Şekil 4.16.</b> Mikronukleus sonuçları.....	86



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
<b>Çizelge 2.1.</b> Ticari olarak üretilen mikroalglerin uygulama alanları .....4	
<b>Çizelge 2.2.</b> Biyoteknolojik uygulamaları ve mikroalgler .....5	
<b>Çizelge 2.3.</b> Mikroalgal Ürünler .....10	
<b>Çizelge 2.4.</b> <i>S.platensis</i> 'in biyokimyasal kompozisyonu.....13	
<b>Çizelge 2.5.</b> Mikroalgal ürünlerin pazar öngörülleri .....16	
<b>Çizelge 2.6.</b> Fikosiyaninin <i>in vitro</i> çalışmalarla belirlenmiş antioksidatif özellikleri .....23	
<b>Çizelge 2.7.</b> Sodyum nitrat ve fenilalanin konsantrasyonlarının <i>S.maxima</i> 'nın fenolik ve flavonoidleri üzerine etkisi.....28	
<b>Çizelge 2.8.</b> ISO 10993 Medikal Cihaz Testleri .....34	
<b>Çizelge 2.9.</b> Toksikite Testlerinin Kategorileri .....36	
<b>Çizelge 3.1.</b> Modifiye Zarrouk Ortamının İçeriği.....46	
<b>Çizelge 3.2.</b> <i>Spirulina platensis</i> optimum üretim koşulları.....50	
<b>Çizelge 3.3.</b> Protein analizinde kullanılan örnek, standart ve reaktifler .....51	
<b>Çizelge 3.4.</b> ISO 10993-12'nin belirttiği ekstraksiyon oranları.....54	
<b>Çizelge 3.5.</b> Mikronukleus analizi sırasında yapılan işlemler.....63	

## ÇİZELGELER DİZİNİ (Devam)

### ÇİZELGE

### SAYFA

- Çizelge 4.1.** *Spirulina platensis* Modifiye Lowry Yöntemine göre protein miktarı.....67
- Çizelge 4.2.** *Spirulina platensis* fikosiyenin miktarı.....68
- Çizelge 4.3.** Cilt kremi mikronukleus sonuçları.....85

**KISALTMALAR DİZİNİ**

EPA	Eikosapentaenoik asit
AA	Araşidonik asit
DHA	Dokosahekzaenoik asit
GLA	Gamma linolenik asit
SOD	Süperoksit dismutaz enzimi
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür
PBS	Fosfat tampon çözeltisi



## 1. GİRİŞ

Son yıllarda insan sağlığına olumsuz herhangi bir etkisi olmayan, biyoyumlu, biyobozunur, çevreci katkı maddelerine karşı özel bir ilgi oluşmuştur. Biyoteknolojinin de hızla gelişmesi ve hayatımıza girmesiyle birlikte yeni ürünler ve yeni teknolojiler hızla geliştirilmektedir. Bunlara bağlı olarak da gıda, kozmetik, ilaç üretimi gibi birçok alanda sentetik ürün ve üretimler yerine biyolojik ürünlere yönelim vardır.

Dünya genelinde 30,000'in üzerinde mikroalg çeşidi olduğu öngörülmektedir. Şu ana kadar bunlardan sadece bir kaç yüz tanesi akademik olarak çalışılmış ve bunların da sadece bir kaç tanesine ticari anlamda ilgi gösterilmiştir. Bu da demektir ki mikroalg sektörü, girişimcilerine büyük kazanç ve olanaklar vaat etmektedir.

Mikroalgler ve mavi-yeşil algler, son yıllarda yüksek besin değerleri, pigment, vitamin gibi değerli kimyasalları ve biyoaktif bileşenleri, yüksek büyüme hızları nedeniyle giderek önem kazanmaktadır.

Mikroalgler, gıda, yem, akuakültür, tarım, tıp, eczacılık ve kozmetik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Deniz algleri ve kullanım olanakları üzerindeki çalışmalar çok uzun yıllardan beri yapılmaktadır. M.Ö. 2700 yıllarında Kral Shen Nung, algleri ilk kullanan kişi olarak bilinmektedir. Alglerden ilk olarak kozmetik sanayinde renk maddesi olarak, Roma İmparatorluğu'nda Virjil ve Heros zamanında yararlanılmıştır (Kaba vd., 2006). Geçmişte Romalılar ve Mısırlılar tarafından kozmetik amaçlı, Uzak Doğu ülkelerinde gıda ve Avrupa ülkelerinde gübre olarak kullanıldığı bilinmektedir.

*Spirulina*'nın, Texcoco gölü kıyısında yaşayan Aztekler tarafından tüketildiğine ilişkin en eski kaynak 1524 yılına dayanmaktadır. Ayrıca Çad gölü kıyısında yaşayan Kanembu Kabilesi yerlileri de bu besini çok eski çağlardan beri tanımakta ve yiyecek olarak tüketmektedirler. Ayrıca Aztekli kadınlar *Spirulina*'yı ciltlerine sürerek daha parlak ve sağlıklı ciltlere kavuşmuşlardır. Ancak, ticari kültürlerinin yapılması ve bilimsel alandaki çalışmaların başlaması; ürünün 1963 yılında Fransız Petrol Araştırma Enstitüsü tarafından ortaya çıkarılarak, % 60–70 oranında protein içeren *Spirulina* algi laboratuvar koşullarında üretmeleriyle olmuştur.

Kozmetik sektöründe her gün geliştirilen onlarca alternatif ürün olmasına rağmen biyolojik ürünlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda alger güzellik enstitüleri tarafından Türkiye'de oldukça yaygın olarak kullanılmakta ve alg katkılı kozmetik ürünlerinin çeşidi artmaktadır.

Ülkemizde üretimi yapılmakta olan *Spirulina*, kozmetik sanayinde önemli bir katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmayla birlikte hem katma değeri olan yerli ve doğal bir ürünün geliştirilmesi hem de üniversite-sanayi işbirliğinin kurulması sağlanacaktır.

Bu çalışmanın amacı, *Spirulina* katkılı ürünlerin Türkiye'de uygulamalarına genel bir alt yapı oluşturmak ve *Spirulina* katkılı cilt kreminin biyoyumluluğunu hücre kültürlerinde *in vitro* olarak araştırmaktır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Mikroalglerin Kullanım Alanları

Mikroalgler, ökaryotik protistaları ve prokaryotik mavi-yeşil algleri kapsayan oldukça geniş tek hücreli organizmalar grubudur. Mikroalgler, geniş bir çevresel yayılıma sahiptir: öfotik (ışık alan bölgeler) sucul bölgelerde yaygın olmakla birlikte tropikal mercan kayalıklarından kutup bölgelerine kadar geniş aralıkta ekstrem habitatlarda da bulunmaktadır ve dünyanın fotosentetik aktivitesinin hemen hemen yarısına katkıda bulunmaktadır. Ayrıca dünya biyomasının % 70'inden fazlası için besin zincirinin temelini oluşturmaktadırlar. Mikroalgler, çevresel ve biyoteknolojik olarak oldukça önemli ve değerli kaynaklardır (Day et al., 1999).

Mikroalgler, yüzyıllardır insanlar tarafından kullanılmaktadır. Özellikle *Spirulina*, *Nostoc* ve *Aphanizamenon* gibi türleri de kapsayan yenilebilir mavi-yeşil algler binlerce yıldır kullanılmaktadır. Bununla birlikte mikroalglerin kültivasyonu çok daha yenidir (Spolaore et al., 2006). Ticari olarak üretilen mikroalgler, çizelge 2.1 ve 2.2'de de görüldüğü gibi çok farklı uygulama alanlarına sahiptirler.

**Çizelge 2.1.** Ticari olarak üretilen mikroalglerin uygulama alanları (Becker, 1995).

I.	Gıda	Çocuk ve yetişkinlerde besin yetersizliğine (eksikliğine) karşı Protein desteği
II.	Yem	Beyaz ve kırmızı et için beslenen hayvanlarda, balık ve kabukluların beslenmesinde protein/vitamin desteği
III.	Sağlıklı Beslenme Ürünleri	Sağlıklı besin ürünlerinde algal biyokütlenin katkı ve destek amacıyla kullanımı
IV.	Terapötikler	$\beta$ -karotenin cilt kanser tedavilerinde kullanımı/ Algal antibiyotiklerin yara tedavilerinde enzimatik hidrolizatların deri metabolizmasını güçlendirmekte kullanımı/ Prostaglandin, $\alpha$ -linolenik asidi stimülatör olarak kullanması ve kolesterol sentezini düzenleyici olarak kullanımı/ İzotopik bileşiklerin tıbbi araştırmada kullanımı
V.	Pigmentler	$\beta$ -karoten'in gıda renklendirici ve gıda destekleyici (provitamin a) olarak kullanımı/ Ksantofillerin tavuk ve balık yemlerinde kullanımı/ Fikobilinin gıda renklendirici kozmetik ve analitik reaktif olarak kullanımı
VI.	Kimyasallar	Gliserol, gıdalarda, içeceklerde, kozmetikte, farmasötiklerde kullanımı/ yağ asitleri, lipidler, vaksılar, steroller, hidrokarbonlar, amino asitler, enzimler, vitamin C ve E/ Polisakkaritlerin kıvam arttırıcı ve iyon değiştirici olarak kullanımı
VII.	Yakıt	Uzun zincirli hidrokarbonların ve esterlenmiş lipidlerin yakıt olarak kullanımı/ hidrojen, biyogaz
VIII.	Hormonlar	Oksinler, gibberalinler ve sitokininler
IX.	Diğerleri	Biyo gübre, toprak düzenleyici, atık arıtımı



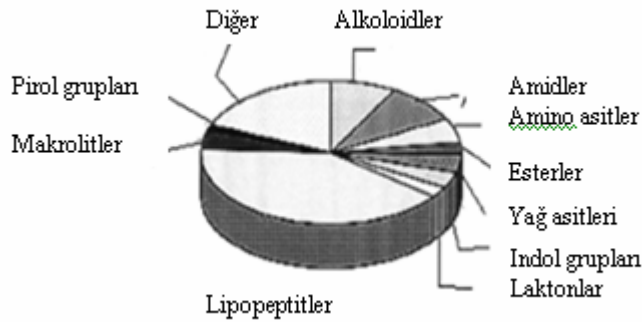
**Çizelge 2.2.** Biyoteknolojik uygulamaları ve mikroalgler (Pulz and Gross, 2004).

<b>Tür/Grup</b>	<b>Ürün</b>	<b>Uygulama Alanı</b>	<b>Reaktör</b>
<i>Spirulina platensis/</i> <i>Cyanobacteria</i>	Fikosiyanin, biyokütle	Sağlık, kozmetik	Açık havuz, doğal göller
<i>Chlorella vulgaris/</i> <i>Chlorophyta</i>	Biyokütle	Sağlık, gıda supplementi, kozmetik	Açık havuz, fotobiyoreaktör
<i>Dunaliella salina/</i> <i>Chlorophyta</i>	Karotenoidler, $\beta$ -karoten	Sağlık, gıda supplementi, yem sanayii	Açık havuz
<i>Haematococcus</i> <i>pluvialis/</i> <i>Chlorophyta</i>	Karotenoidler, astaksantin	Sağlıklı gıda, farmasötikler, yem katkısı	Açık havuz, fotobiyoreaktör
<i>Odontella aurita/</i> <i>Bacillariophyta</i>	Yağ asitleri	Farmasötikler, kozmetik, bebek mamaları	Açık havuz
<i>Porphyridium</i> <i>cruentum/</i> <i>Rhodophyta</i>	Polisakkaritler	Farmasötikler, kozmetik, beslenme	Tübüler fotobiyoreaktör
<i>Isochrysis galbana/</i> <i>Chlorophyta</i>	Yağ asitleri	Hayvan yemi	Açık havuz
<i>Phaedactylum</i> <i>tricornutum/</i> <i>Bacillariophyta</i>	Lipit, yağ asitleri	Beslenme, yakıt üretimi	Açık havuz
<i>Lyngbya majuscula/</i> <i>Cyanobacteria</i>	İmmun düzenleyiciler	Beslenme, farmasötikler	

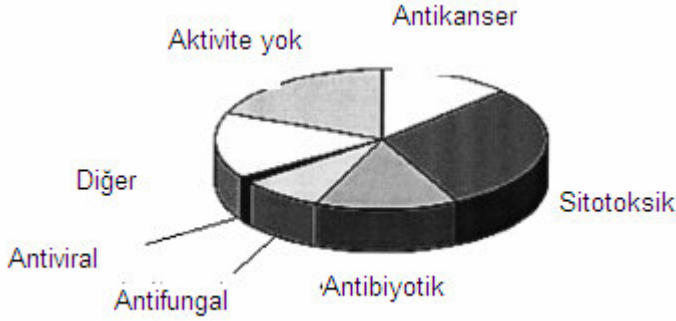
Mikroalgler, klasik gıda preparasyonlarının besinsel içeriklerini arttırabilmektedir. Bu nedenle insan ve hayvan sağlığını pozitif etkilemektedir. Bu etki, mikroalglerin biyokimyasal kompozisyonundan kaynaklanmaktadır (Spolaore et al., 2006).

Çeşitli mikroalg türlerinin yüksek protein içeriği, protein ve gıda desteği olarak düşünülmesinin esas nedenidir. Hemen hemen tüm alglerin amino asit motifleri, diğer gıda proteinleri ile uygun olarak kıyaslanabilir. Hücreler, tüm amino asitleri sentezleyebildiğinden insan ve hayvanlara gerekli esansiyel amino asitleri sağlamaktadır. Karbonhidratlar, nişasta, glukoz, şeker ve diğer polisakkaritler şeklinde bulunabilmektedir. Algal hücrelerin ortalama lipit içeriği % 1–70 oranında değişmektedir. Mikroalgler ayrıca, hemen hemen tüm esansiyel vitaminlerin önemli kaynağını oluşturmaktadır (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, C, E, biotin, folik asit ve pantotenik asit gibi). Vitaminler, algal hücrelerin besinsel değerlerini geliştirmektedir fakat buldukları miktar, çevresel faktörler, hasat işlemleri ve hücreleri kurutma metotlarına göre değişmektedir (Spolaore et al., 2006).

Bazı mikroalg ve mavi-yeşil algler, biyoaktif bileşenleri nedeniyle antiinflamatuvar ve antioksidan etki göstermektedir (Şekil 2.1). Siyanobakteriyel biyoaktif komponentler, antitümör, antiviral, antibiyotik gibi farklı biyolojik aktivitelere sahiptirler (Şekil 2.2). İmmun etkininin yanısıra mavi-yeşil algler, metabolizmayı düzenlemekte ve geliştirmektedirler. *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* ve *Oscillatoria* gibi mavi-yeşil algler çok çeşitli sekonder metabolitleri üretmektedir (Singh et al., 2005).



**Şekil 2.1.** Mavi-yeşil alglerden elde edilen değerli kimyasal ve biyoaktif maddeler (Singh et al., 2005).



**Şekil 2.2.** Mavi-yeşil alglerden elde edilen bileşiklerin biyolojik aktiviteleri (Singh et al., 2005).

Yaklaşık olarak, makroalgleri de içeren 500 alg türü, insan gıda veya ürünlerinde kullanılmaktadır. 160 civarında tür de ticari olarak önemli kabul edilmektedir. Pratik bir bakış açısı olarak, algal bir gıda ürünü için biyokütlenin üretilmesi en kolay yaklaşımlardan biridir (Day et al., 1999).

Mikroalgler, klorofil, karotenoidler ve fikobiliproteinler açısından da oldukça zengindirler. Bu biyoaktif moleküller, oldukça geniş uygulama alanlarına sahiptirler (Spolaore et al., 2006). Mavi-yeşil algler önemli miktarlarda karotenoid ( $\beta$ -karoten, likopen, lutein) içermektedirler. Bu karotenoidler, antioksidan etkinin yanısıra antiinflamatuvar aktiviteye de sahiptirler. Mavi-yeşil alglerin bu antiinflamatuvar aktivitesi, özellikle fikosiyanın pigmentinden kaynaklanmaktadır (Singh et al., 2005).

Mavi-yeşil alglerden elde edilen fikobiliproteinler, birçok uygulama alanı olması nedeniyle ticari anlamda giderek önem kazanmaktadır. Bu moleküllerin birincil uygulama alanı, doğal boya olarak kullanılmalarıdır. Fakat insan sağlığını destekleyici özellikleri ve geniş aralıkta farmasötik uygulamaları üzerine birçok çalışma mevcuttur. Fikosiyanın, doğal gıda pigmenti olarak sentetik pigmentler yerini almaktadır. Sakızlarda, içeceklerde, günlük ürün ve ruj, far gibi kozmetik

ürünlerde renklendirici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca fikobiliproteinler, klinik ve immunolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Sekar and Chandramohan, 2007).

Mikroalgler, tablet, kapsül ve sıvı olmak üzere değişik formlarda marketlerde yerini almıştır. Çeşitli biyokimyasal özellikleri nedeniyle mikroalgler, besin desteği veya doğal gıda renklendiricisi olarak kullanılmaktadırlar. Ticari uygulamalar 4 tür üzerinde yoğunlaşmaktadır: *Spirulina (Arthrospira)*, *Chlorella*, *Dunaliella salina* ve *Aphanizamenon* (Spolaore et al., 2006).

#### Hayvan yem katkısı;

Mikroalgler, insan beslenmesindeki kullanımının yanı sıra balık kültüründen (akuakültür) evcil ve çiftlik hayvanlarına kadar geniş çeşitlilikte hayvan yemlerine ilave edilebilmektedir. Hatta dünya genelinde bugünkü algal üretimin % 30'u hayvan yemi uygulamaları için ve *Spirulina* üretiminin de % 50'nin üzerindeki miktarı besin desteği olarak satılmakta ve kullanılmaktadır (Chopra and Bishnoi, 2008).

Mikroalgler, larva beslenmesinde kısa bir dönem için, yumuşakçalar ve karidesler tarafından doğrudan tüketilmekte veya küçük balık larvalarını beslemek için gıda desteği olarak doğrudan kullanılmaktadırlar. En çok kullanılan türler; *Chlorella*, *Tetraselmis*, *Isochrysis*, *Pavlova*, *Phaeodactylum*, *Nannochloropsis*, *Chaetoceros*, *Skeletonema* ve *Thalassiosira* cinslerine ait bazı türlerdir (Spolaore et al., 2006).

Mikroalgler, biyogübre olarak kullanılmaktadırlar. Alg tallusları, toprakta uzun zaman kaldığında kolayca parçalanarak bol miktarda azot ve kalsiyum açığa çıkarır. Hindistan'da mavi-yeşil algler sığ toprak havuzlarda yetiştirilir ve su buharlaştığında kurumuş olan algler

biyogübre olarak satılır. Bu doğal azot kaynağı, kimyasal gübrelere oranla daha ekonomiktir. Biyolojik azotun kullanımı inorganik azottan daha yararlıdır. Gerekli azotu daha çok karşılamasından başka, bitki gelişimini artırırken, karbon bileşiklerinin ve diğer nutrientlerin serbest bırakılmasını sağlar (Ahsan et al., 2008).

Protein içeriği, mikroalglerin besinsel değerinin belirlenmesindeki en büyük faktördür. Bunun yanı sıra doymamış yağ asitleri (EPA, AA, DHA gibi) içeriği büyük öneme sahiptir. Gerçekten de bazı yağ asitleri birçok sucul hayvanlar için esansiyeldir. Ayrıca mikroalgal vitamin içeriği de dikkate alınmalıdır (Spolaore et al., 2006).

Kozmetik uygulamalarında mikroalgler, katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Birçok kozmetik ve bakım ürününün formülasyonunda yerlerini almaktadırlar (Spolaore et al., 2006).

Mikroalglerden, yağ asitleri, pigmentler ve kararlı izotoplar gibi yüksek değerli biyomoleküllerin elde edilmesi de mümkündür (Çizelge 2.3) (Spolaore et al., 2006).

**Çizelge 2.3.** Mikroalgal ürünler (Day et al., 1999).

<b>Organizma</b>	<b>Ürün/Kullanım</b>	<b>Referans</b>
<i>Botryococcus braunii</i>	Fuel yakıt	Murray and Thompson, 1977
<i>Chlorella</i>	Kararlı izotop biyokimyasalları	Behrens et al., 1989
<i>Chlorella</i>	Askorbik asit	Running et al., 1994
<i>Chlorella</i>	Leutin	Shi ve ark., 1997
<i>Euglena gracilis</i>	$\alpha$ - tokoferol	Ogbonna et al., 1998
<i>Haematococcus spp.</i>	Astaksantin	Johnson and An, 1991
<i>Porphyridium</i>	Polisakkarit	Becker, 1994
<i>Spirulina spp.</i>	Fikobiliproteinler	Glazer, 1994
<i>Dunaliella spp.</i>	$\beta$ - karoten	Ben-Amotz and Avron, 1980
Çeşitli	$\omega$ -3 yağ asitleri	Barclay et al., 1994
Çeşitli	Antikanser aktivitesi	Gerwick et al., 1994
Çeşitli	Antimikrobiyal aktivite	Patterson et al., 1994
Çeşitli	Hidrojen	Benemann, 1990
Çeşitli	Vitamin	Baker, 1981

Mikroalgler, özellikle havuz ve göletlerin kullanıldığı birçok kirlilik kontrol sisteminde anahtar bileşenlerdir. Bunları iki kategoriye ayırabiliriz; derinliğin 1 metrenin üzerinde olduğu ve alglerle sınırlandırılmış yüzey sularından oluşan fakültatif havuzlar ile genellikle sıg ve mekanik karıştırılmalı olan yüksek hızlı oksidasyon havuzları (HROP). HROP olması durumunda alglerin önemi yalnızca oksidatif bakteriler tarafından kullanılan O<sub>2</sub>'i sağlamak değildir. Bunlar aynı zamanda ağırlıklı olarak karbon asimilasyonlarının % 50'sini doğrudan heterotrofik beslenme ile sağlayan *Euglena*, *Chlorella*, and *Scenedesmus* türlerini de içeren fakültatif heterotroflardır (Day et al., 1999).

Bu sistemlerde alglerin verimliliği göreceli olarak artar. Bu, hayvan yemleri için algal biyokütle üretimi ile kombine atık arıtan pilot ölçekli bir prosesin gelişimine yol gösterir. Algler ayrıca, çıkışında dezenfeksiyonu kapsayan atıksu arıtımında ikincil fonksiyonların birkaçını gerçekleştirirler.

Mikroalg araştırmalarında *in vitro* teknolojilerinin gelecekteki uygulamaları, yararlı ürünlerin biyolojik kaynağı olarak ve ekolojik araştırmalarda sahip olduğu roller açısından iki önemli alanı kapsayacaktır (Day et al., 1999).

Algal biyoteknoloji için pek çok potansiyel vardır. Gelişmeye devam edecek olan ürün alanları, lipitleri (özellikle doymamış yağ asitleri), pigmentleri ve biyoaktif bileşenleri içerir. Ek olarak en önemli yatırım, çıkış gazından karbondioksiti ve diğerkirleticileri gidermek için algal teknolojilerin gelişimidir (Japonyada RITE programında olduğu gibi). Ancak ekonomik başarının anahtarı geliştirilmiş verimlilik olacaktır. Bu da, proses ve ürün optimizasyonuna ek olarak, fotobiyoreaktörlerin ve klasik fermantasyon tesislerinin her ikisinin de gelişimini gerektirecektir. Fakat henüz aşırı üretici suşların (overproducing strain) genetik manipulasyon, klasik mutanegenesis veya direkt seleksiyon teknikleri ile seleksiyonu ve geliştirilmesi gerçekleştirilmemiştir. Ayrıca, modern moleküler yaklaşımlar ürün aralığının artışı için kullanılabilir (Day et al., 1999).

### **2.1.1. *Spirulina*'nın kullanımı**

*Spirulina* ilk olarak, 1827'de P.J. Turpin tarafından izole edilmiştir. 1844'te Wittrock ve Nordstedt, Montevideo'nun civarında *Spirulina jeneri f. platensis* olarak adlandırılan helikal, mavi-yeşil bir mikroalgin bulunduğunu bildirmişlerdir. Ancak 1852'de Stizenberg ilk

taksonomik raporu hazırlayarak spiral görünümlü (Şekil 2.3) morfolojik yapısından dolayı bu genusa *Arthrospira* adını vermiştir (Sanchez et al., 2003).

*Spirulina platensis*'in taksonomisi:

Domain: Bacteria

Phylum: Cyanobacteria

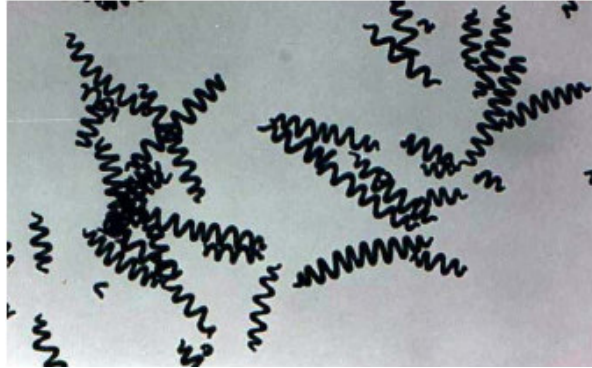
Class : Cyanophyceae

Order: Oscillatoriales

Family: Oscillatoriaceae

Genera: Spirulina

Species: *S.platensis*



Şekil 2.3. *Spirulina platensis*'in üretimi esnasında çekilmiş mikroskopik görüntüsü

*Spirulina platensis*, temel morfolojik özelliği olan, çok hücreli silindirik trikomların kendi uzunluğu boyunca heliks biçiminde dizilişi ile tanınan filamentli bir mavi-yeşil alg türüdür. Filamentleri tektir, kendi eksenini etrafında kayarak hareket eder ve heterosistleri yoktur (Chronakis, 2000). *Spirulina platensis*, içerdiği yüksek miktarda protein, pigmentler ve GLA gibi ürünler bakımından öneme sahip olan bir mavi-yeşil alg türüdür. Bu özelliklerinden ötürü *Spirulina platensis*'in bir besin desteği olarak ticari yığın kültürleri 1970'lerin sonunda başlamıştır (Kılıç vd.,



2006). *Spirulina*, sağlık, gıda, yem ve biyokimyasal ürünler olarak uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Ahsan et al., 2008).

*Spirulina*, yüksek miktarlarda proteinle birlikte (kuru ağırlığının % 65'ine varan oranlarda), önemli miktarlarda esansiyel yağ asitleri (GLA gibi), polisakkarit, fikobiliproteinler, karotenoidler, vitamin (özellikle B<sub>12</sub>) ve çeşitli mineralleri içerdiğinden önemli bir gıda kaynağı oluşturmaktadır. *Spirulina platensis*'in biyokimyasal kompozisyonu çizelge 2.4'de görüldüğü gibi, belirtilmektedir. Ayrıca karotenoid/klorofil oranı 0,3 olarak bildirilmektedir (Tornabene et al., 1985).

**Çizelge 2.4.** *S.platensis*'in biyokimyasal kompozisyonu (Fox, 1996).

<b>Kompozisyon</b>	<b>(%) Kuru Ağırlık</b>
Protein	60-71
Karbonhidrat	13-16.5
Lipit	6-7
Mineral	6.4-9

*Spirulina* ürünleri, diyetlerde fonksiyonel gıda olarak tüketilmektedir (Richmond, 2004). İnsanlar için bir besin desteği olarak kullanımının yanında, hayvan yemi olarak akuakültürde ve kanatlı hayvan endüstrisinde yoğun şekilde kullanımı mevcuttur (Kılıç vd., 2006).

*Spirulina* yüksek protein içeriğinden dolayı akuakültürde yem maddesi olarak kullanılmaktadır. Bu özelliği ile *Spirulina*, diğer hayvan orijinli yem maddelerinden daha ekonomiktir.

Mavi-yeşil algler klorofilin klorofil-a formuna sahiptirler. Ayrıca hepsinde karakteristik biliprotein pigmentleri olan, fotosentezde yakalayıcı pigment olarak fonksiyon gösteren fikobilinler mevcuttur.

Fikobilinlerin bir sınıfı olan fikosiyeninler ise mavi renklidir ve klorofil-a ile birlikte bakteriye mavi-yeşil rengini verirler. Bazı mavi-yeşil algler ise kırmızı renkli fikobilin olan fikoeritrini üretirler. Bu pigmente sahip olan türler ise kırmızı ya da kahve renklidir. Mavi-yeşil alglerde görülen sitoplazmik yapılar arasında gaz vezikülleri de bulunur. Bu özellikleri nedeniyle suyun yüzeyine çıkabilmektedirler (Madigan et al., 2000).

*Spirulina*, C-fikosiyenin ve allofikosiyenin olmak üzere iki biliprotein içerir. Bu mikroalgin protein fraksiyonunun yaklaşık % 20'si, suda çözünen mavi bir pigment olan fikosiyaninden oluşmaktadır (Cohen, 1997). Bu biliproteinlerin, yüksek molar absorpsiyon katsayıları, floresan kuantum verimleri, yüksek fotostabiliteyi nedeniyle flow sitometrisi için floresan işaretlemeye, yüksek verimli klinik analizler ve fikobiliprotein temelli reaktif oksijen türleri testlerinde kullanılmaktadır. Fikobiliproteinlerin yüksek serbest radikal uzaklaştırabilme kapasitesi antitümör ve antikanser ilaçlarında yararlı kılmaktadır. Ayrıca, *Spirulina* en zengin mikroalgal GLA kaynağıdır (Richmond, 2004).

*Spirulina*'nın mavi-yeşil rengi, sahip olduğu iki pigmentten ileri gelir: fikosiyenin ve klorofil. Bu iki pigment karotenoidler olarak adlandırılan başka bir grup pigment ile kombine edilir. *Spirulina*'dan ekstrakte edilen fikosiyenin gıda sanayiinde renklendirici, dondurmalarda boyar madde ve kozmetik endüstrisinde doğal boya olarak kullanılmaktadır. Fakat bu madde ışığa duyarlı olduğundan ağarmasından korumak için itina gösterilmelidir.

Karotenoidler ve karotenoproteinler, kabukluların çeşitli renklerinden sorumludurlar. Astaksantin kaplan karidesin (*Panaeus monodon*) kırmızı rengi ile alakalı baskın karotenoid olduğu gösterilmiştir (Ahsan et al., 2008).

*Spirulina platensis* pacifica suşu oksidatif proses yoluyla astaksantine dönüşen  $\beta$ -karoten ve zeaksantini en yüksek seviyede içeren doğal kaynaktır. *Spirulina*'nın *P.monodon* için pigment olarak etkinliği zeaksantin sayesinde ve zeaksantin 4-ketozeaksantin aracılığıyla astaksantine dönüşmektedir (Ahsan et al., 2008).

Son 10 yıl içinde, araştırmalar *Spirulina*'nın potansiyel terapötik etkileri üzerine yoğunlaşmıştır. Preklinik ve klinik çalışmalar, biyokütlenin, kolesterol ve nefrotoksisitenin azalması, çeşitli patojenik virusların replikasyonunun inhibisyonu ve immun sistemi güçlendirici gibi birtakım sağlık ve terapötik etkilerini ortaya koymuştur. Örneğin, *Spirulina platensis*'ten elde edilen sülfatlanmış polisakkaritin, kalsiyum Spirulinan, Herpes simplex virus tip 1, Influenza A virusu ve HIV-1 gibi bazı zarflı viruslerin replikasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur (Richmond, 2004).

## 2.2. Mikroalglerin Kozmetikte Kullanımı

Canlı organizmalar, farmasötik, sağlık ve kozmetik uygulamalar için biyolojik aktif maddelerin ana kaynağını oluşturmaktadırlar. Fotosentetik organizma olan mikroskopik yapıdaki mikroalgler terapötik amaçlı çok eski yıllardan beri kullanılmaktadır. Mikroalgler, yararlı terapötik ajan ve etken madde olarak kullanılabilen biyolojik aktiviteye sahip birçok yeni bileşiğin önemli üreticilerindedir.

Mikroalgler, vitamin ve yağ asitleri gibi çok sayıda biyoaktif bileşiğin kaynağıdır ve birçok mikroalg türü provitamin A, vitamin B6, B12, biotin gibi önemli vitaminleri sentezlemektedir (Cohen, 1999). Mikroalgal biyokütle üretimi ve bu biyokütleden farklı ürünlerin alt akım işlemleri için çok sayıda yeni teknik sistemler geliştirilmiştir (Çizelge 2.5) (Pulz and Gross, 2004).

**Çizelge 2.5.** Mikroalgal ürünlerin pazar öngörülere (Pulz and Gross, 2004).

Ürün Grubu	Ürün	Perakende Satış Değeri (U.S. \$*10 <sup>6</sup> )	Gelişimi
Biyokütle	Sağlıklı gıda	1,250-2,500	Büyüyen
	Fonksiyonel gıda	800	Büyüyen
	Yem katkısı	300	Hızlı gelişen
	Akuakültür	700	Hızlı gelişen
	Toprak şartlandırıcı		Gelecek vaad eden
Renklendirici bileşenler	Astaksantin	<150	Başlangıç
	Fikosiyanin	>10	Durgun
	Fikoeritrin	>2	Durgun
Antioksidanlar	β- karoten	>280	Gelecek vaad eden
	Tokoferol		Durgun
	Antioksidan ekstraktlar	100-150	
	ARA	20	Büyüyen
	DHA	1,500	Hızlı gelişen
	PUFA ekstraktları	10	
Özel ürünler	Toksinler	1-3	
	İzotoplar	>5	

Özellikle diatomlar, dinoflagellatlar ve Chrysophyta üyelerinden bazı mikroalgler,  $\gamma$ -linolenik asit, araşidonik asit, eikosapentanoik gibi doymamış yağ asitlerini içermektedir. Bu esansiyel yağ asitleri, birçok

hastalığın tedavisi ve önlenmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca beslenmede de önemli bir yeri vardır (Cohen, 1999).

Mavi-yeşil algler ve mikroalgler yaklaşık olarak 3 milyar yıldır atmosferde bulunan oksijenin büyük bir çoğunluğunu üretmektedirler. Aynı zamanda bu organizmalar, süperoksit ve oksijen radikali gibi zararlı serbest radikalleri de üretmektedirler. Kendi membran lipitlerini ve hücrel komponentlerini bu zararlı radikallere karşı korumak için suda çözülebilir askorbik asit ve süperoksit dismutaz ile yağda çözülebilir tokoferol ve karotenoidleri üretmek gibi çeşitli oksidatif savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Gudin, 2009).

Antioksidatif komponentler, doğal kaynaktan elde edildiği için kozmetikteki uygulamaları hızla gelişmektedir. Mikroalglerden elde edilen diğer antioksidatif veya biyoaktif bileşenlerle kombinasyonu özellikle güneş koruyucu kozmetiklerde yüksek talep görmektedir. Fonksiyonel nütrosötikler için mikroalgal ürünlerin radikal uzaklaştırma kapasiteleri giderek artan bir öneme sahip olmaktadır (Pulz and Gross, 2004).



Şekil2.4. *Spirulina platensis*'in mikroskoptaki görüntüsü (x100)

Bazı mikroalg türleri cilt bakım (skin-care) ürünlerinde yerini almıştır ki bunlardan başlıcaları *Spirulina* (*Arthrospira*) ve *Chlorella*'dir.

Bazı kozmetik firmaları kendi mikroalg üretim sistemlerini kurmak için yatırım yapmaktadır. Mikroalgal ekstraktlar, *anti-aging* kremleri, yenileyici bakım ürünleri ve yumuşatıcı losyonlar gibi yüz ve cilt bakım ürünlerinde bulunmaktadır. Ayrıca güneşe karşı koruyucu ve saç bakım ürünlerinde de katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak bulunan iki örnek ve firmalar tarafından iddia edilen özellikleri şu şekildedir:

*Spirulina*'dan (*Arthrospira*) elde edilen proteince zengin ekstraktlar erken cilt yaşlanmasının belirtilerini onarmaktadır, cildi sıkılaştırıcı etki göstermektedir ve kırışıklıkların oluşumunu önlemektedir (Spolaore et al., 2006).

*Chlorella vulgaris*, oksidatif stresin etkilerini azaltan, antioksidan aktivite gösteren bir diğer mikroalg türüdür. Wu et al., *Spirulina* ve *Chlorella* ekstraktlarının antioksidan aktivitesini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucu, *Spirulina*'nın toplam fenolik içeriğinin *Chlorella*'dan 5 kat daha fazla olduğunu göstermiştir ve *Spirulina*'nın antioksidan aktivitesinin *Chlorella*'dan daha fazla olduğu saptanmıştır (Chopra and Bishnoi, 2008).

*Chlorella vulgaris* ekstraktları ciltte kollajen oluşumunu stimule ederek doku yenilenmesini (rejenerasyonunu) desteklemekte ve kırışıklıkları azaltmaktadır.

Son zamanlarda Pentapharm tarafından iki yeni ürün piyasaya sürülmüştür: Cilt sıkılaştırıcı özelliğe sahip *Nannochloropsis oculata* ekstraktı (kısa ve uzun dönem etkili) ile hücre proliferasyonunu stimule edici ve cildin enerji metabolizmasını olumlu yönde etkileyen *Dunaliella salina* ekstraktı (Spolaore et al., 2006).

### **2.2.1. Kozmetikte etkili olan doğal etken maddeler**

Kozmesötik olarak adlandırılan maddeler, farmasötik özelliğe sahip kozmetikleri ifade etmektedir. Kozmesötikler, fonksiyonel kozmetik ürünleri ile bakım ürünlerini kapsamaktadır. Kozmesötiklerin cilt üzerindeki en yaygın “*anti-aging*” etkisi, bariyer fonksiyonlarının artırılması ve ışıklardan koruma sağlamasıdır (Draelos, 2007).

#### **2.2.1.1. Antioksidanlar**

Çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma mekanizması vardır. Bu savunma mekanizmasını oluşturan bileşiklere “antioksidanlar” denir.

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler:

- i. Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
- ii. Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
- iii. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
- iv. Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar (Gökpınar vd., 2006).

Antioksidanlar, doğal antioksidanlar ve ilaçlar olmak üzere iki grupta toplanabilir.

Doğal antioksidanlar arasında enzimler (superoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutation peroksidaz-GP, glutation redüktaz, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoxidad) ve mikromoleküller ( $\beta$ -karoten, A-vitamini, C-vitamini, E-vitamini, tokoferoller, glutation, N-asetil sistein, metionin, polifenoller, koenzim Q10) sayılabilir (Gökpınar vd., 2006).

Fenolik bileşikler, gıda ve kozmetik ürünlerin raf ömrünü arttırmakla kalmaz aynı zamanda birçok biyolojik sistemde antioksidan olarak da etki eder (Colla et al., 2007).

Antioksidanlar, kozmetik ürünün formülasyonunda yer alan hammaddelerin oksidasyonunu önlemek amacıyla eklenir. Krem gibi kozmetik ürünlerin, oksidasyona ve mikrobiyal ataklara karşı kararlı olması gerekmektedir. Antioksidan maddeler sadece cildi zararlı ışıklardan korumak ve serbest radikalleri uzaklaştırmakla kalmaz aynı zamanda ürünün formülasyonundaki maddeleri de oksidasyona karşı korur.

Antioksidan bileşikler bakımından, karasal kaynaklı gıdaların yanı sıra fotosentetik mikroalg hücreleri yüksek antioksidan özelliklere sahip yararlı pek çok metabolitin önemli bir kaynağıdır. Alglerdeki yüksek antioksidan etki glutatyon, askorbik asit (C-vitamini), vitamin-A, vitamin-E,  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini öncü maddesi),  $\beta$ -karoten, flavonoidler, hidrokinonlar, fikosiyantinler, prolin, mannitol, fenolik bileşikler ve poliaminler gibi antioksidan bileşikleri yüksek düzeyde içermesinden ileri gelir (Gökpınar vd., 2006).

Bazı mikroalg türleri çeşitli stres koşulları altında üretilirse (azot yetersizliği, yüksek ışık şiddeti, yüksek tuzluluk v.b.), hücre içinde  $\beta$ -karoten, astaksantin, zeaksantin, lutein gibi yüksek antioksidan özelliklere sahip pigment maddelerinin biriktirilmesi sağlanabilir (Gökpınar vd., 2006).



Radikalleri süpürme etkisi ile inhibe eden *Chlorella* ekstraktı,  $\alpha$ -tokoferol ve karotenoidler gibi lipofilik antioksidan bileşikler içerir. *Chlorella sorokiniana* H-84'den izole edilen yüksek moleküler ağırlıktaki fotosentetik pigmentler gibi antioksidanlar kozmetik ve farmasötik alanında kullanılabilir doğal antioksidanlardır (Gökpınar vd., 2006).

Provitamin A aktivitesi gösteren karotenoidler  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -karoten ve kriptoksantindir. Yanı sıra zeaksantin ve lutein pigmentleri *Dunaliella salina* (Chlorophyceae)'dan elde edilmektedir (Gökpınar vd., 2006).

### a. Fikosiyanin

Moleküler Ağırlık: 232 kDa

Kompozisyonu:  $\alpha$  ve  $\beta$  alt ünitelere sahip protein yapıda bir pigmenttir.

Saflık:  $A_{620} / A_{280} > 4.0$

Maksimum Absorbsiyon: 620 nm

Ekstinsiyon Katsayısı:  $E_{620}^{196} = 70$

Fikobiliproteinler, fikobilizomları oluşturan yüksek oranda korunmuş kromoprotein gruplarıdır. Fikobilizomlar, mavi-yeşil algler ve ökaryotik gruplarda fotosentez mekanizmasında ışık absorblayan makromoleküler protein kompleksleridir. En bilinen fikobiliprotein sınıfları, allofikosiyanin, fikosiyanin ve fikoeritrindir. Bu gruplar,  $\alpha$  ve  $\beta$  protein alt ünitelerinden oluşmaktadır ve farklı izomerik prostetik gruplar taşımaktadır (Romay et al., 2003).

Fikosiyanin, mavi-yeşil alglerden elde edilen suda çözülebilir, floresan özellik gösteren protein bağlı bir pigmenttir. Fikosiyanin, terapötik ve besinsel değeri yüksek olan *Spirulina*'nın en fazla miktarda

içerdiği pigmentlerden biridir. Fotosentetik bir pigment olan fikosiyanın, güçlü bir antioksidan ve antiinflamatuvar olarak tanımlanan doğal bir bileşiktir. Gıda renklendirmede, kozmetikte ve biyomedikal araştırmalarda kullanılmaktadır. *Spirulina platensis*'ten elde edilen fikosiyanın antioksidan ve radikal uzaklaştırma özelliği olduğu *in vivo* ve *in vitro* modellerde gösterilmiştir. Bu özelliği ile oksidatif stres tarafından indüklenen hastalıklara karşı potansiyel bir terapötik ajan haline gelmiştir (Benedetti et al., 2004).

Reaktif oksijen türlerinin inflamasyon, nöral dejenerasyona bağlı hastalıklar, ateroskleroz ve kanser gibi birçok hastalığın patolojik prosesinde etkili olduğu bilinmektedir. Fikosiyanın, antioksidan, antiinflamatuvar ve nöral koruyucu etkileri olduğu saptanmıştır. Bu şekilde oksidatif stres ve inflamasyona bağlı birçok rahatsızlığın önlenmesinde önemli bir role sahiptir (Romay et al., 2003).

Fikosiyanın farmakolojik özelliklerinin yanı sıra çeşitli farmasötik özellikleri de daha önceden belirtilmiştir. Fikosiyanın hepatoprotektif etkisi sitokrom p450 tarafından yönlendirilen ara metabolitlerin oluştuğu reaksiyonları inhibe etmesinden kaynaklanmaktadır. Serbest radikaller, membran lipitleri ile etkileşerek doku hasarına neden olan lipit peroksidasyonu zincir reaksiyonlarını başlatmaktadır (Bhat and Madyastha, 2000).

Yapılan çalışmalarda fikosiyanın antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi incelenmiştir. *In vivo* ve *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada bu doğal ürünün çizelge 2.6'da da görüldüğü gibi alkoksil ve hidroksil radikallerini uzaklaştırabildiği bulunmuştur (Romay et al., 2003).

**Çizelge 2.6.** Fikosiyaninin *in vitro* çalışmalarla belirlenmiş antioksidatif özellikleri (Romay et al., 2003).

<b>Reaksiyon Sistemi</b>	<b>Etkisi</b>	<b>Yazar</b>	<b>Yıl</b>
Hipoksantin-ksantin oksidaz ile üretilen süperoksit	-	Romay et al.	1998
Hidrojen peroksit-ferröz sülfattam üretilen hidroksil radikali	Uzaklaştırma (scavenge)	Romay et al. Bhat et al.	1998 2000
AAPH termolizisi ile üretilen peroksil radikali	Uzaklaştırma (scavenge)	Lissi et al. Bhat et al.	2000 2000
Singlet oksijen	Süpürme (quench)	Tapia et al.	1999
Lipit peroksidasyonu	İnhibisyon	Romay et al. Bhat et al.	1998 2000
Peroksinitrit	Uzaklaştırma (scavenge)	Bhat et al.	2001

Fikosiyaninin alkoksil, hidroksil ve peroksil radikallerini uzaklaştırabilme aktivitesinin olduğu yapılan çalışmalarla saptanmıştır. Ayrıca ROS tarafından yönlendirilmiş lipit peroksidasyonu, yağ asiti yan zincirlerinin lipit peroksitlere dönüşümünü tetikleyerek hücre membranlarının hasar görmesine neden olmaktadır. Bu da membranların yapısal bütünlüğünü bozmakta ve biyokimyasal fonksiyonlarını değiştirmektedir. Fikosiyaninin,  $Fe^{+2}$ -askorbik asit veya serbest radikal öncüsü AAPH (2-aminopropan hidroklorid) ile muamele edilmiş rat karaciğer mikrozomlarındaki lipit peroksidasyonunu önemli oranda inhibe ettiği saptanmıştır (Romay et al., 2003).

*In vivo* modellerde fikosiyaninin, peroksit tarafından indüklenen inflamasyonun etkisine bakılmıştır. Yapılan denemelerde antiinflamatuvar

etkinin, hidroksil radikallerinin uzaklaştırılması ile olabileceği bulunmuştur (Romay et al., 2003).

### **b. $\beta$ -karoten**

$\beta$ -karoten yağda çözünen bir pigmenttir ve yağda çözünen vitamin-A'nın hammaddesidir. Oksidasyon ile oluşan serbest radikalleri süpürme etkisi ile uzaklaştırır ve oksidasyonun neden olduğu hastalıklara karşı korur. Karotenoidler arasında lutein'in antioksidan aktivitesi  $\alpha$ - veya  $\beta$ -karoten kadar yüksek değildir. Ancak karotenoidlerin hücre için antioksidan aktivitesi karışım yüzdelere bağlıdır. Karotenoidlerin antioksidan aktivitelerine bağlı olarak kanser oluşumunu inhibe ettikleri pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bazı karotenoidlerin UV ışık ve kimyasalların neden olduğu tümörleri inhibe ettikleri ve immun cevabı arttırdıkları, yüksek antioksidan aktiviteye sahip vitamin-E ve  $\alpha$ -tokoferol'ün ise cildi UV ışığın neden olduğu hasarlara karşı koruduğu gösterilmiştir (Gökpinar vd., 2006).

Karotenoid biriktirme yeteneğine sahip olan türler arasında *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella zoofingiensis*, *Dunaliella salina* ve *Haematococcus pluvialis*'i sayabiliriz (Gökpinar vd., 2006).

#### **2.2.1.2. Enzimler ve enzimlerin kozmetikteki yeri**

Cildimiz, çevresel zarar ve tahribatlara karşı korunmak için koruyucu mekanizma durumundadır. Bu koruyucu mekanizmalardan en yaygın olarak bilineni ve üzerinde çalışılanı, serbest radikallerin uzaklaştırılmasıdır (Lods et al., 2000). Serbest radikaller tüm hücresel komponentlere saldırıp başta DNA gibi nükleik asitler olmak üzere hücre organellerine ve bileşenlerine zarar vermektedir. Serbest radikal

uzaklaştırıcılar, tehlikeli bileşenleri nötralize ederek cildin korunmasına yardımcı olmaktadır.

Süperoksit dismutaz ve peroksidazın sinerjetik olarak çalıştığını gösteren çalışmalar mevcuttur. SOD, süperoksit anyonunu nötralize ederken peroksidaz da cildin lipid bariyeri için zararlı etkisi bulunan hidrojen peoksiti nötralize etmektedir. Böylece serbest radikallere karşı yüksek oranda koruma sağlanmaktadır.

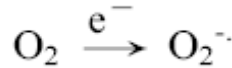
Enzimlerin kozmetikte kullanımı uzun yıllardır savunulmaktadır. Proteolitik enzimler (bromelain, papain, vs.) peeling ve yumuşatma, pürüzsüzleştirme amacıyla kullanılmaktadır. Fakat proteazların, etkilerinin kontrolünün zor olması ve enzimin iritasyona sebep olabilmesi gibi cilt üzerine uygulanmasıyla ilgili birtakım problemleri bulunmaktadır. Enzimler üstün kozmetik stabiliteyi ile varılmaktadırlar. Bu enzimler, çevresel etkilerle oluşan serbest radikalleri yakalayıp nötralize edebilmektedirler (Lods et al., 2000).

### **Süperoksit dismutaz enzimi (SOD)**

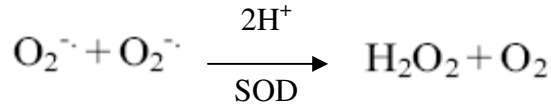
Reaktif oksijen türleri (ROS) içerisinde ilk olarak üretilen süperoksit anyonudur ( $O_2^-$ ) (Şekil 2.5). Süperoksit radikalleri, hücrelere oldukça toksiktir. Bu radikaller, hücre membran lipidlerindeki doymamış yağ asitlerine saldırarak membran yapısına zarar vermekte ve hücrenin yaranmasına, zarar görmesine neden olmaktadır (Lods et al., 2000). Ayrıca kontrolsüz bir seri univalan redüksiyonlar ile  $O_2^-$ , hidroksil radikaline ( $OH^\cdot$ ) dönüşmektedir. Hidroksil radikali, en reaktif oksijen türüdür. Hidroksil oluşumunu ve biyomoleküllerin oksidasyonunu önlemek için süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksite dönüşmektedir (Şekil 2.6). SOD, sadece

savunmanın ilk hattı değil aynı zamanda bu reaksiyonu katalizleyebilen tek enzimdir. Bu nedenle SOD antioksidan mekanizmasında anahtar bir pozisyona sahiptir (Janknegt et al., 2007).

Bakır-çinko içeren SOD oldukça yüksek stabilitededir ve böylece kolayca izole edilebilmektedir. Bu enzim, maya, bitki ve hayvanlar gibi ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Ökaryotik hücrelerden şimdye kadar elde edilen tüm bakır çinko SOD'ler (CuZnSOD) 2 subunit proteine ve 32000 moleküler ağırlığa sahiptir (Lods et al., 2000).



Şekil 2.5. Süperoksit radikallerinin oluşumu



Şekil 2.6. Süperoksit dismutazın etkisi

### 2.2.2. *Spirulina*'nın antioksidan aktivitesi ve kozmetikte kullanımı

*Spirulina* içerdiği makro ve mikronutrientler ile değerli bir gıda katkı maddesi haline gelmiştir. Başta gıda katkı maddesi olarak kullanılan *Spirulina*, protein ve esansiyel nutrientler açısından zengin bir mavi-yeşil algdir. *Spirulina*, antioksidan özellik gösterdiği bilinen fenolik asitler, tokoferol (E vitamini öncül maddesi) ve  $\beta$ -karoten içermektedir (Chopra and Bishnoi, 2008).

Bu zengin nutrient kaynağı başlıca, yüksek oranda protein, demir,  $\gamma$ -linolenik yağ asidi, karotenoidler, vitamin B1 ve B2'yi içermektedir. Ayrıca belirli alerjilerin, anemi, kanser, hepatoksisite, viral ve kardiyovasküler hastalıklar, hiperglisemi, inflamasyon gibi rahatsızlıkların tedavisinde etkili olduğu *in vivo* ve *in vitro* olarak kanıtlanmıştır (Chopra and Bishnoi, 2008).

*In vivo* ve *in vitro* çalışmaların sonuçları *Spirulina*'nın antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle hem *in vitro* hem de *in vivo* sistemlerde antioksidan koruma sağladığını göstermiştir (Miranda et al., 1998). *Spirulina*'nın birçok alanda kullanımı cazip hale gelmiştir. *Spirulina*'nın bu özelliklerini ona içerdii bileşenler kazandırmaktadır:

- $\omega$ -3 ve  $\omega$ -6 yağ asitleri
- $\beta$ -karoten
- $\alpha$ -tokoferol
- Fikosiyanin
- Fenolik bileşikler
- Ca-spirulan (Chopra and Bishnoi, 2008).

**Çizelge 2.7.** Sodyum nitrat ve fenilalanin konsantrasyonlarının *S.maxima*'nın fenolik ve flavonoidleri üzerine etkisi (El-Bakyl et al., 2009).

İşlem	Toplam Fenol (mg g <sup>-1</sup> d.w)	Fenolik (%)	Oran	Toplam Flanvonoid (mg g <sup>-1</sup> d.w)	Flavonoid (%)	Oran
2.5 (g. L <sup>-1</sup> ) NaNO <sub>3</sub>	4.51 ± 0.23	0.45	1.00	1.32 ± 0.03	0.13	1.0
+ 50 mg.L <sup>-1</sup> L-PA	5.68 ± 0.33	0.57	1.26	1.54 ± 0.08	0.15	1.2
+ 100 mg L <sup>-1</sup> L-PA	7.36 ± 0.36	0.74	1.63	1.94 ± 0.06	0.19	1.5
3.125 (g.L <sup>-1</sup> ) NaNO <sub>3</sub>	5.19 ± 0.35	0.52	1.15	1.45 ± 0.07	0.14	1.1
+ 50 mg L <sup>-1</sup> L-PA	8.64 ± 0.27	0.86	1.91	2.25 ± 0.13	0.22	1.7
+ 100 mg L <sup>-1</sup> L-PA	10.95 ± 0.47	1.09	2.42	3.31 ± 0.21	0.33	2.5
3.777 (g.L <sup>-1</sup> ) NaNO <sub>3</sub>	6.54 ± 0.54	0.65	1.45	1.93 ± 0.05	0.19	1.5
+ 50 mg L <sup>-1</sup> L-PA	12.94 ± 0.93	1.29	2.86	4.65 ± 0.14	0.46	3.5
+ 100 mg L <sup>-1</sup> L-PA	16.96 ± 1.24	1.69	3.75	5.12 ± 0.22	0.51	3.9

El-Bakyl ve ark.nın (2009) yaptığı bir çalışmada, *S.maxima*'nın büyüme ortamına farklı konsantrasyonlar NaNO<sub>3</sub> ve fenilalanin (L-PA) ilavesi ile fenolik ve flavonoid değişimleri incelenmiştir. Çizelge 2.7' de görüldüğü üzere ortama L-PA'nın ilavesi fenolik ve flavonoid üretimini arttırmıştır.



Desai and Sivakami (2007), *Spirulina platensis*'in süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, askorbat peroksidaz gibi antioksidan enzimleri eksprese ettiğini bildirmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda *Spirulina*'nın yüksek SOD aktivitesi gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmaya göre *Spirulina platensis*'in 8 U/mL volumetrik SOD aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (Güneş vd., 2009).

*Spirulina*'da yaklaşık % 4.6 oranında bulunan tirosin, hücrelerin yaşlanmasını geciktirir. Ayrıca güneş ışınlarına karşı koruma sağlamaktadır (Tietze, H., 2004).

Birçok alg türü içerisinde *Spirulina* ve *Chlorella in vivo* ve/veya *in vitro* antioksidan potensiyelleri nedeniyle özel bir öneme sahiptirler. *Spirulina* önemli bir nutrient kaynağı olmakla kalmayıp aynı zamanda endüstriyel kullanım (mavi pigmentleri, emülsifiye edici, kıvam arttırıcı ve jelleştirme ajanı vs.) için de yaygın olarak üretilmektedir. *Spirulina*'nın kimyasal kompozisyonu vitamin, mineral ve protein kaynakları açısından yüksek oranda besleyici olduğunu göstermektedir. Bunlardan başka  $\omega$ -3 ve  $\omega$ -6 doymamış yağ asitleri, provitaminler ve fenolik bileşenler gibi diğer komponentlerini de içermektedir. Ayrıca bu alglerin büyük ölçekli üretimlerinin yapılabilmesi de bir diğer avantajlarıdır (Miranda et al., 1998).

Günümüzde gıda ve kozmetik gibi ürünleri oksidatif deteriorasyondan korumak ve canlı hücreler üzerindeki oksidatif hasarı minimize etmek için bitkisel materyaller gibi doğal kaynaklardan elde edilen yeni ve güvenli antioksidanların bulunmasına yönelik bir ilgi oluşmuştur. Sentetik antioksidanların karsinogenezi tetiklediği düşünülmektedir ve bu yüzden kullanımı azalmaktadır (Miranda et al., 1998).

Miranda et al., (1998) tarafından *Spirulina maxima* ekstraktının lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan bir çalışmada, *Spirulina*'nın metanolik ekstraktında  $\beta$ -karoten ve toplam tokoferol içerikleri 27.5 mg/l ve 18 mg/l olarak bulunmuştur. Toplam fenolik bileşenlerin miktarı 1 g kuru alg materyali metanol ekstraktında 15.4 mg toplam fenolik miktarına karşılık olan 96.3 mg/l olarak bulunmuştur. Metanolik algal ekstraktta bulunan sasiklik asit, trans-sinamik asit, sinaptik, klorojenik guimik ve kafeik asit gibi fenolik bileşikler tek başına ya da sinerjistik olarak antioksidan aktivitesinden sorumlu olabilmektedir. *Spirulina* ekstraktında bulunan klorojenik ve kaffeik asit gibi fenolik bileşikler diğer asitlere göre daha etkili antioksidanlardır. Sakata et al., algal ekstraktları içeren farklı marin türlerde antioksidanları araştırmıştır. Birçok alg türü güçlü antioksidan özelliği göstermiştir (Chopra and Bishnoi, 2008).

Manoj et al., (1992) nceki çalışmalarından birinde, *Spirulina*'nın alkol ekstraktının lipit peroksidasyonunu  $\alpha$ -tokoferol (%35), bir çeşit antioksidan olan butillenmiş hidroksiAnisol (BHA) (%45),  $\beta$ -karoten (%48) gibi kimyasal antioksidanlara göre %65 gibi daha fazla oranda inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Chopra and Bishnoi, 2008).

Zhi-gang et al., (1997) tarafından yürütülen bir diğer çalışmada superoksit, lipit ve hidroksil radikali üreten 3 sistem kullanılarak *Spirulina*'nın sıcak su ekstraktının 2 fraksiyonunun antioksidan etkisine bakılmıştır. Her iki fraksiyon da önemli ölçüde hidroksil radikallerini uzaklaştırma kapasitesi göstermiştir. *Spirulina*'nın bu antioksidan etkisi,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten ve fenolik bileşiklerin tek başına veya sinerjik halde etki göstermelerine dayandırılmaktadır (Chopra and Bishnoi, 2008).

*Spirulina platensis*'in farklı ekstraktları, basınçlı solvent tekniği (PLE) ve 4 farklı solvent kullanılarak elde edilmiştir. Tüm ekstraktlar

önemli ölçüde antioksidan aktivitesi göstermişlerdir (Chopra and Bishnoi, 2008).

*Spirulina* ekstraktları başta Avrupa ülkelerinde olmak üzere kozmetik formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kozmetik ürünler arasında, cilt nemlendiricileri, *anti-aging* kremler, şampuanlar ve yüz maskeleri gibi birçok ürün bulunmaktadır. Önemli esansiyel ve vitamin içeriği nedeniyle cildi besler, korur, nemlendirir ve cilde parlaklık kazandırır. *Spirulina*'dan elde edilen protein, yağ asitleri,  $\beta$ -karoten ve ekstraktlar, ciltteki porlardan penetre olarak cilt yapısını geliştirir, nemlendirir ve kırışıklıkları azaltır. Ayrıca herhangi bir yan etki ve alerjik etki oluşturmamaktadır. *Anti-aging* etkisi göstererek kırışıklıkları azaltır, cildi sıkılaştırır. Cildin genç kalmasını sağlar.

Ayrıca, *Spirulina platensis* ekstraktlarının klinik denemelerle selülite karşı etkili olduğu bulunmuştur. *Spirulina* hücrelerinden elde edilen ekstraktlar, karotenoid, doymamış yağ asitleri, esansiyel amino asitler ve mineraller açısından zengin kaynaklardır. Karotenoidler, cildi oksidatif strese karşı korumaktadırlar. Bu alg ekstraktı, cildin elastikiyetini ve sıkılığını stimüle ederek cildin güçlenmesine yardımcı olmaktadır (Schmid et al., 2009).

Bu uygulamalardan yararlanılarak kozmetik ürünlerin formülasyonuna eklenerek cilt özelliklerini geliştirici doğal bir ürünün geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

### ***Spirulina*'nın Antioksidan Mekanizması**

Serbest Radikalleri Uzaklaştırarak: Süperoksit anyonu, hidroksil, alkoksil ve peroksil radikali gibi zararlı serbest radikaller, mitokondride oksijen moleküllerinin kısmi redüksiyonu nedeniyle çeşitli dokularca üretilmektedir. Hepatoksik, nefrotoksik ve nörotoksik kimyasallar, serbest radikallerin üretimine neden olur. *Spirulina* ekstraktı ve önemli bir bileşeni olan fikosiyanın, oluşan bu serbest radikalleri uzaklaştırmaktadır (Chopra and Bishnoi, 2008).

Alkoksil ve hidroksil radikallerinin fikosiyanın ile uzaklaştırıldığı kemiluminesans (CL) testi ile belirlenmiştir (Chopra and Bishnoi, 2008).

Lipit Peroksidasyonunun İnhibisyonu: Serbest oksijen radikalleri tarafından yönlendirilen lipit peroksidasyonunun hücre membranlarına zarar ve yıkımın önemli bir nedeni olduğu belirtilmiştir. Basit bir başlangıç, yüzlerce yağ asitinin yan zincirlerinin lipit peroksitlerine dönüşümü ile sonuçlanabilmektedir. Oluşan bu lipit peroksitler, hücresel membranların yapısal bütünlüğü ve biyokimyasal fonksiyonlarını değiştirmektedir. *Spirulina*'nın önemli bir antioksidan bileşeni olan fikosiyanınin, Fe<sup>+</sup>-askorbik asit veya serbest radikal öncüsü AAPH ile muamelesinden sonra rat karaciğer mikrozomlarında meydana gelen lipit peroksitlerinin artışı inhibe ettiği bulunmuştur (Chopra and Bishnoi, 2008).

Detoksifikasyon Enzimleri ile: *Spirulina*, ilaç metabolizması ve antioksidan enzimlerin yanısıra detoksifikasyon enzimleri üzerinde düzenleyici bir etkiye sahiptir. Antioksidan enzimlerle ilişkili olarak, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon reduktaz ve glutatyon peroksidaz, *Spirulina*'nın belirli seçilmiş dozları ile önemli ölçüde artmıştır (Chopra and Bishnoi, 2008).

### **2.3. *In Vitro* Sitotoksisite ve Genotoksisite Testleri**

Modern biyoteknoloji kullanılarak üretilen ticari bileşikler ve ürünler, gıda katkı maddesi, kemoterapötik ajan (kozmetik, ilaç vs) ve pestisit olarak kullanılmaktadır. Farmasötik ve kozmetik ajanı olarak kullanılan, ilaç, kozmetik ürünü veya gıda katkısı gibi yeni geliştirilen ürünlerde, vücut içi veya dışı implant olarak kullanılan her türlü materyalin non-toksik olması gerekmektedir. Ayrıca, anti-kanser ajanı olarak geliştirilen ilaçların da aktivite gösterebilmesi için sitotoksisite önemli bir faktördür. Bu ürünlerin piyasaya sürülmesinden önce biyouyumluluk ve sitotoksisite testlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Bunun için çok değişik inceleme yöntemleri vardır. Bunlardan biri de çok sayıda hayvan denemelerinin yapılmasıdır. Ancak bunun gerek etik boyutu gerek ekonomik boyutu düşünüldüğünde *in vitro* denemeler önem kazanmaktadır (Freshney, 1994).

Biyomateryal ve medikal cihazların biyouyumluluğu farklı yöntemler ile test edilebilmektedir. ISO 10993 medikal cihazların biyolojik değerlendirilmesi yönetmeliğinde bu testler farklı başlıklar altında incelenmektedir (Çizelge 2.8).

**Çizelge 2.8.** ISO 10993 Medikal Cihaz Testleri (ISO 10993-1, 1999).

ISO Standart No	Standart Adı
10993-1	Test sistemlerinin Seçimi
10993-2	Hayvan Hakları Gereklilikleri
10993-3	Genotoksisite, Karsinojenite ve Üreme Toksikitesi Testleri
10993-4	Kan ile Etkileşimde olan Malzemelerin Testleri
10993-5	<i>In vitro</i> Sitotoksisite Testleri
10993-6	İmplantasyon Sonrası Lokal Etkilerin Tespiti İçin Testler
10993-7	Etileoksit Sterilizasyonu Sonrası Kalıntıların Test Edilmesi
10993-8	Referans Madde Seçimi
10993-9	Materyallerin Degredasyon Ürünlerinin Varlığının Test Edilmesi
10993-10	İrritasyon ve Sensitizasyon Testleri
10993-11	Sistemik Toksikite Testleri
10993-12	Örnek Hazırlama Klavuzu
10993-13	Polimerik Materyallerin Salınan Degredasyon Ürünlerinin Belirlenmesi ve Kantitasyon Klavuzu
10993-14	Seramiklerden Salınan Degredasyon Ürünlerinin Belirlenmesi ve Kantitasyon Klavuzu
10993-15	Metallerden Salınan Degredasyon Ürünlerinin Belirlenmesi ve Kantitasyon Klavuzu
10993-16	Degradasyon Ürünlerinin ve Çözülme Özelliğindeki Ürünlerin Toksikokinetik Çalışma Dizaynının Belirlenmesi
10993-17	Sağlığa Dayalı Risk Belirleme Yöntemleri ile Çözünme Özelliğindeki Maddelerin Tolere Edilebilen Limitlerinin Belirlenmesi
10993-18	Materyallerin Karakterizasyonu

Toksisite;

- Mutajenite,
- Karsinojenite,
- Teratojenite, (Teratojen, normalden farklı anlamındadır. Teratojenite ise, teratojen etkinin oluşma potansiyelidir.)
- Kronik sitotoksosite

gibi etkilere neden olabilmektedir.

Hayvan denemeleri, yeni bileşik ve/veya materyallerin güvenliğinin araştırılmasında önemli bir role sahiptir. Ancak,

- Hayvan denemelerinin ekonomik boyutu
- Etik kaygılar
- İnsan metabolizmasıyla alakalı olarak hayvan modellerinin sınırlı olması
- Standardizasyon sorunları

gibi nedenler araştırmacıları, alternatif test metotlarını geliştirmeye yöneltmiştir.

### **2.3.1. *In vitro* sitotoksosite testleri**

Sitotoksitenin tanımı, hücrelerin ölmesine veya metabolizmasını değiştirmesine bağlı olarak değişebilmektedir. Alerjik ya da yangısal bir olaya neden olabilir ve bunun *in vitro*'da eşik değerini (*endpoint*) belirlemek zordur (Freshney, 1994).

Sitotoksosite testlerinde hücrenin büyümesi ve canlılığı ele alınabilir. Hücre büyümesi, büyüme eğrisindeki klonal büyüme ve populasyon sayısındaki net artış, biyokütlerdeki değişim (toplam protein veya DNA) veya solunum, DNA, RNA, protein sentezi gibi metabolik

aktiviteler ile ölçülebilmektedir. Hücre canlılığı ise plazma membranı bütünlüğü ve yukarıda sayılan büyüme kriterleri gibi parametrelerle belirlenebilmektedir. Çizelge 2.9' da farklı test kriterlerine göre yapılan *in vitro* uygulamalar görülmektedir.

**Çizelge 2.9.** Toksikite testlerinin sınıflandırılması (Freshney, 2001)

	Test	<i>In Vitro</i> Uygulanabilirlik
Canlılık	Membran geçirgenliği Metabolik aktivite	Evet
Üremenin devamlılığı	Koloni oluşturma	Evet
Mutajenite	Seçici ortamda sürdürülebilirlik Kardeş kromatit değişimi	Evet
Malignan transformasyon	Suspansiyonda klonlama	Evet
Teratojenite	Civciv, sıçan, fare embriyosu	Hayır
İnflamasyon	Deri Göz İç organlar	Hayır (?)

Bu amaca yönelik çeşitli *in vitro* sitotoksikite testleri vardır. Bunlardan bazıları:

- Laktat dehidrogenaz yöntemi (LDH)
- ATP
- Nötral kırmızısı
- İzotop salınımı
- Floresan metodu



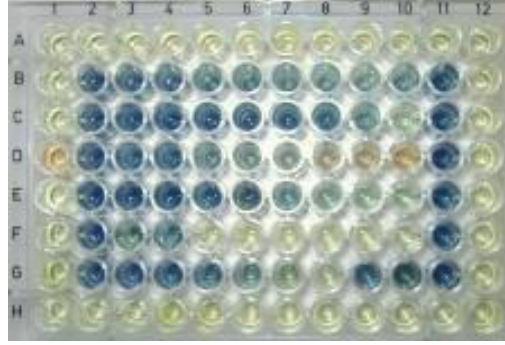
- MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür testi)

### **2.3.1.1.MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür Testi)**

Kolorimetrik bir test olan MTT testi, hücre büyümesi/ölümünü, mitokondrinin tetrazolyum tuzlarını (MTT) renkli bir ürün olan formazana dönüştürme yeteneği ile indirekt olarak ölçmektedir. Bu da spektrofotometrik olarak belirlenebilmektedir (Mather ve Barners, 1998). Bu test, MTT'nin (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür) mitokondriyal süksinat dehidrogenaz aracılığı ile indirgenmesini ölçmektedir. Mitokondrinin tetrazolyum tuzlarını (MTT), spektrofotometrik olarak ölçülebilen renklendirilmiş formazan ürününe dönüştürebilme yeteneği, bu testin ana prensibini oluşturmaktadır (Mather and Barners, 1998).

MTT ajanı, belirteci (reagent) hücelere girerek mitokondrilere gelir. Burada çözünmez formdaki, renkli, formazan ürününe indirgenir. Oluşan formazan ürünü, hücre membranından geçemez, böylece sağlıklı hücrelerde birikir (Fotakis et al., 2006).

Bu testin dayanak noktası, canlı, büyüyen hücrelerin mitokondrilerinin aktif olarak MTT'yi formazana dönüştürebilmesidir. Tersine çevirecek olursak, ölü ya da boyanabilen hücreler mitokondriyal fonksiyonlarını yitirdikleri için daha az MTT formazana dönüşür (Şekil 7). MTT hücelere eklenerek standart kültür koşulları altında 2 saat inkube edilir. Daha sonra suda çözünmeyen formdaki formazanı çözmek için ekstraksiyon tamponu eklenir. İnkube edildikten sonra UV-visible spektrofotometrede 570 nm'deki absorbans ölçülür (Mather and Barners, 1998).



**Şekil 2.7.** 96 gözlü pleytlerde MTT testi ve formazan oluşumu

MTT yerine XTT de kullanılmaktadır. Bu boyanın avantajı, XTT'nin formazan ürünü suda çözülebilir formda olmasıdır (Mather ve Barners, 1998). Bu testin avantajı ise, LDH gibi, 96 gözlü mikrotitre pleytlerde gerçekleştirilebilmesidir (Mather and Barners, 1998).

### **2.3.2. *In vitro* genotoksisite testleri**

Genotoksisite, genetik materyal üzerinde oluşabilecek zararlı etkiler olarak bilinmektedir. Gen mutasyonları formunda oluşan DNA hasarı, kromozomal hasarlar, rekombinasyon ve sayısal kromozom değişiklikleri kalıtsal etkilerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu yüzden genotoksisite testlerinde DNA'da oluşan değişiklikler belirlenir (Anonymous, 2003).

Farmasötiklerin onaylanması için geniş kapsamda genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi gerekmektedir. Tek bir test ilgili genotoksik ajanların belirlenmesi için yeterli olmamaktadır. Bu yüzden genotoksisite için hem *in vitro* hem de *in vivo* test gruplarının uygulanması gerekmektedir.

Testlerde standart gruplar genel olarak iki tip genetik hasarı belirlemek için seçilir:

1.Gen mutasyonları

2.Kromozom hasarı (Note For Guidance On Genotoxicity, 1998).

*In vitro* genotoksisite için, AMES testi, klastogenisite testi (*in vitro* memeli kromozom aberasyonu testi), mikronukleus testi ve *comet assay* gibi testler yapılmaktadır.

ISO'ya göre genetik toksisitenin belirlenebilmesi için 3 çeşit test yapılmalıdır. Bu testler, bakteride ters mutasyon testi (AMES testi), genetik mutasyonun veya kromozom aberasyonlarının belirlenebilmesi için *in vitro* memeli kromozom aberasyonu veya fare lenfoma testi, *in vitro* mikronukleus testi şeklinde sıralanabilir (ISO 10993-3, 1999).

### **2.3.2.1. *In vitro* kromozom aberasyonları**

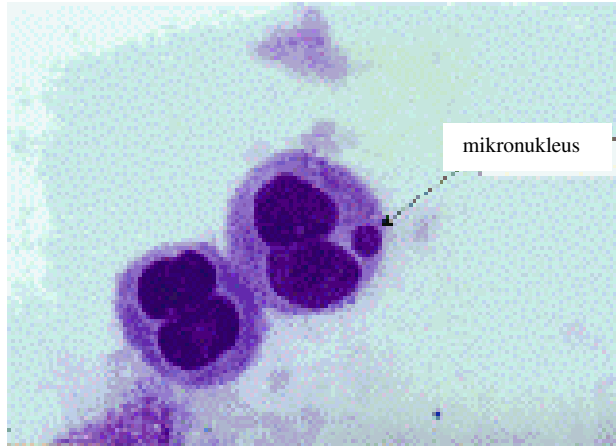
Hücre hatları üzerinde veya primer hücre kültürleri ile yapılır. Testte kullanılacak olan hücreler, kültürde büyüme kapasitelerine, karyotip kararlılığına, kromozom sayısı, kromozom çeşitliliğine ve kendiliğinden oluşan kromozom aberasyonlarının frekansına göre seçilmektedir. Olası memeli karsinojenlerin veya mutajen ajanların belirlenebilmesi için yapılmaktadır (ISO 10993-3, 1999).

Testin prensibi:

- Hücre kültürleri metabolik aktivasyon kaynağı varlığında ve yokluğunda test maddesine maruz bırakılır.
- Kimyasal maddeye maruz kalma aşamasından sonra ,önceden belirlenmiş zaman aralıklarında hücre kültürleri metafazı durdurucu maddeyle (kolçisin) muamele edilir.
- Daha sonra metafaz hücreleri boyanır ve mikroskopta kromozom aberasyonlarının oluşup oluşmadığı gözlenir (Anonymous, 1997).

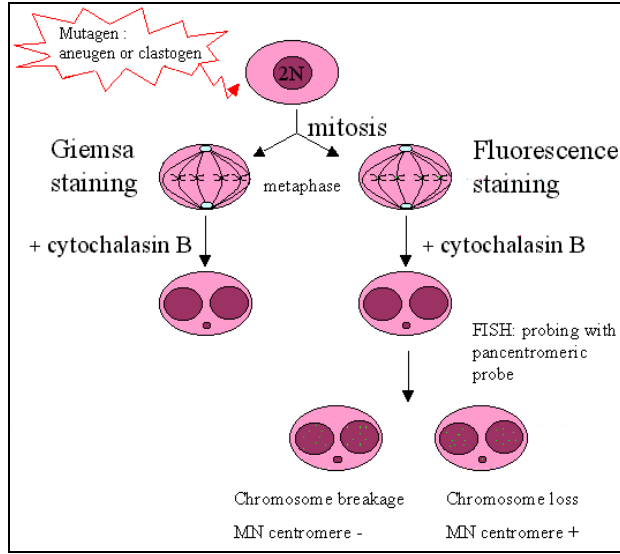
### 2.3.2.2. *In vitro* mikronukleus testi

*In vitro* mikronukleus testi, interfaz hücrelerinin sitoplazmasında bulunan mikronukleuslar gibi küçük membranla çevrili DNA parçalarının oluşumuna neden olan kimyasalların belirlenmesinde kullanılan bir mutajenite testidir. Mikronukleus oluşumu hücre bölünmesinde mitozun metafazdan anafaza geçiş aşamasında gerçekleşir (Şekil 2.9). Bu mikronukleuslar asentrik parçalardan (sentromersiz kromozom parçaları) ya da hücre bölünmesinin anafaz evresinde diğer kromozomlarla birlikte göç edemeyen bütün kromozomlardan meydana gelmektedir (Anonymous, 2004). Bu yüzden bu test hem klastojenik hem de aneugenik kimyasalların belirlenmesinde kullanılabilir. Bu testte hem hücre hatları hem de insan lenfositlerinin primer kültürleri kullanılabilir (Anonymous, 2004).



Şekil 2.8. Metafaz plağında mikronukleuslar

(<http://we.vub.ac.be/~cege/volders/ENG/tests/MN.htm>)



**Şekil 2.9.** Mikronukleus oluşumu ve analizi

(<http://we.vub.ac.be/~cege/volders/ENG/tests/MN.htm>)

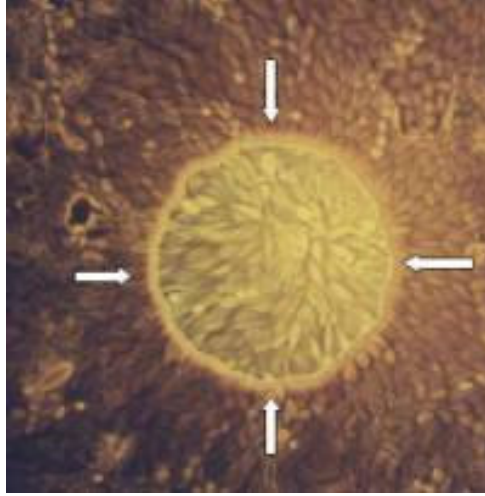
### 2.3.3. *In vitro* yara iyileşmesi

Yara iyileşmesi oldukça kompleks bir biyolojik olaydır. Dokuda, yaranın sonucunda yara iyileşmesi ile sonlanan organize ve karmaşık birtakım hücresel ve biyokimyasal olaylar gelişir. Yaranın daralması, kapanması ve fonksiyonel bariyerin restorasyonu ile sonuçlanan çoğul faktörlü bir süreçtir. Yara iyileşmesi ayrı, fakat birbirleriyle içi içe geçen hemostaz ve inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon olarak adlandırılan 3 ayrı aşamadan oluşur (Nursal vd., 1999).

Yara iyileşmesi testleri araştırmacılara, hücre göçünü ve hücre etkileşimlerini çalışma olanağı sunmaktadır.

Bariyer fonksiyonu bozulan derinin bu özelliğini yeniden kazanabilmesi için epiderminin rejenerasyonu ve derminin onarımı gereklidir. Bir yara, yüzeyi epitelle kaplandığı, madde kaybının sebep olduğu kopukluk giderildiği ve uygun doku direnci geliştiği zaman iyileşmiş sayılır. Epidermal yenilenme esas olarak çoğalan keratinositlerin yara yüzeyine yayılmasıyla oluşur. Yalnızca epidermi içine alan doku kayıplarında epitelizasyon, hem yara kenarlarından hem de dermiste sağlam kalan deri eklerinden gelişir (Şenol, 1995).

Yara iyileşmesi testi, *in vitro* yönlü hücre göçünü çalışmak için geliştirilen basit, ekonomik ve en eski metotlardan biridir. Bu metot, *in vivo* yara iyileşmesi sırasında hücre göçünü taklit etmektedir. Temel aşama, monolayer hücre içerisinde yara oluşturmak, başlangıç aşamasından itibaren yaranın kapanma sürecinde hücre göçünü belirli aralıklarla gözlemlemek ve hücrelerin göç hızını fotoğraflarla karşılaştırmaktır (şekil 2.10). Bu, özellikle hücre-matriks, hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki etkilerini çalışmak, *in vivo*'daki yara iyileşmesini taklit etmek için uygun bir yöntemdir. Ayrıca homojen hücre popülasyonunun göçünü gözlemlemenin yanı sıra bu metot, oluşturulan yaranın kenarındaki hücrelerin bulunduğu hattın itibaren bireysel hücrelerin göç hızını ölçmek için de kullanılmaktadır (Rodriguez et al., 2008; Liang et al., 2007).



**Şekil 2.10.** *In vitro* yara iyileşmesinin görünümü  
(<http://www.biophysics.com/applications/woundhealing.html>)

Canlı hücrelerin yüzey ile olan etkileşimleri biyomateryallerin doku mühendisliği gibi uygulamaları açısından önemlidir. Hücrelerin doku mühendisliğinde kullanılacak materyal üzerinde tutunması, göçü ve proliferasyonu potansiyel uygulamalarına önemli bir bakış sağlamaktadır.

Tremel A. ve ark.'nın (2008) yaptığı bir çalışmada NIH-3T3 fibroblast hücrelerinin doku kültürü flaskında proliferasyonu ve hücre göçü *in vitro* olarak belirlenmiştir. Rastgele dağılmış bireysel hücrelerin konfluent monolayer hücreye gelişimi hücre yoğunluğu ile birlikte ilerlemektedir. Farklı yüzey ve koşullar altında hücre davranışlarını karşılaştırmak için hücre yayılımı ve büyüme hızları kullanılmıştır. Yara iyileşmesi testleri, doku kültüründe farklı hücre tipleri ve kültür koşullarının proliferasyon ve hücre göçü hızlarını tahminlemek üzere yıllardır kullanılmaktadır. Bu testler genellikle ilk olarak büyüyen konfluent monolayer hücre tabakasını içermektedir. Daha sonra küçük bir alanda hasar oluşturulur veya kürdan, pipet ucu vs. yardımıyla ince bir tabaka şeklinde çizilir. Böylelikle *in vitro* yaralar oluşturulmuş olur. Açılan boşluk, zamanla hücrelerin hareketi ve hasarlı bölgeyi doldurmaları mikroskopik olarak gözlemlenir. Bu iyileşme süreci hücre

tipine ve açılan yara alanına bağlı olarak saatler veya günler alabilmektedir

(<http://www.biophysics.com/applications/woundhealing.html>).

Bu çalışmada yara iyileşmesi, geliştirilen cilt kreminin deri hücreleri üzerindeki göçünü ve proliferasyonunu ne şekilde etkilediğini incelemek amacıyla yapılmıştır.



### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Organizmalar

Mavi-yeşil Alg Kültürü: Bu çalışma kapsamında üretilmiş olan *Spirulina platensis* Parachas suşu, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, Mikroalg Kültür Koleksiyonu'ndan (EGE-MACC 38) sağlanmıştır. EGE-MACC aynı zamanda ulusal ilk mikroalg kültür koleksiyonudur.

Hayvan Hücre Kültürü: *In vitro* sitotoksiste, yara iyileşmesi ve proliferasyon çalışmalarında kullanılmış olan HS<sub>2</sub> keratinosit hücre hattı ile HEP 299 insan fibroblast hücre hattı ŞAP Enstitüsü, Hayvan Hücre Kültürü Koleksiyonu (HÜKÜK)'ndan sağlanmıştır. Genotoksiste çalışmalarında kullanılan insan periferik kan kültürü ise Etik Kurul Kararı alınan, kan verme açısından herhangi bir sağlık engeli bulunmayan, kan verme işlemine engel teşkil edebilecek herhangi bir ilaç ve sigara kullanmayan, 18-35 yaş aralığında bulunan sağlıklı bireylerden alınan kan örnekleri ile hazırlanmıştır.

##### 3.1.2. Kullanılan kimyasallar

###### 3.1.2.1. Kültür ortamları ve vasatlar

Mavi-yeşil Alg Kültür Ortamı: *Spirulina platensis*'in kültürü için Modifiye Zarrouk Ortamı kullanılmıştır (Morist, et al., 2001). Ortam içeriği distile suda çözüldükten sonra 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilizasyonu sağlanmıştır. Kültür ortamının kompozisyonu çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Modifiye Zarrowk Ortamının İçeriği (Morist, et al., 2001).

<u>Madde</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
NaCl	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,04
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01
EDTA	0,08
NaNO <sub>3</sub>	2,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
NaHCO <sub>3</sub>	10,8
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	7,6
*A <sub>5</sub>	1 mL
**B <sub>6</sub>	1 mL

*A <sub>5</sub> iz element çözeltisi		**B <sub>6</sub> iz element çözeltisi	
Madde	Miktar(g/L)	Madde	Miktar(g/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0,0022
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,81	KCr(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,096
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,222	NiSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,045
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,075	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	0,018
MoO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O	0,015	TiO <sub>2</sub>	0,016

Hayvan Hücre Kültürü Ortamları: HS<sub>2</sub> keratinosit ve HEP 299 insan fibroblast hücre hattı için %10 fetal sığır serumu (FBS), 10 µg/mL olacak şekilde % 1 L-glutamin ve 10 µg/mL penisilin/streptomisin (Biochrom, Almanya) antibiyotik içeren DMEM/F12 (Sigma, Almanya) besi ortamı kullanılmıştır. HEP 299 fibroblast kültürü için hazırlanan besi ortamına ayrıca %1 oranında sodyum piruvat eklenmiştir.

Periferik kan hücre kültürü için ise, %20 fetal sığır serum (FBS) ve 20 µg/mL penisilin/streptomisin (Biochrom, Almanya), %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 (Biochrom, Almanya) ortamı vasat olarak hazırlanmıştır.

### **3.1.2.2. Tampon, Reaktif ve Cözeltiler**

Protein Analizinde Kullanılan Reaktif ve Cözeltiler:

- Standart BSA (Sığır Serum Albumini) cözeltisi: 700 mg/L
- Reaktif A: %5'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$
- Reaktif B: %1'lik K-Na-tartarat içerisinde %0.5'lik  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Her zaman taze hazırlanır ve reaktifler ayrı ayrı cözölmüştür.)
- Reaktif C: 50 ml reaktif A+ 2 ml reaktif B
- Reaktif D: 1N folin-Ciocalteau (2 N folin reaktifi 1:1 oranında ultra saf su ile seyreltilerek hazırlanmıştır.)
- 1 N NaOH

Ham Ekstrakt İçin Kullanılan Tampon:

0.01 M potasyum fosfat tampon (pH 6.7, 0.15 M NaCl içeren) hazırlanmıştır.

Fikosiyanin Tayininde Kullanılan Tampon:

100 mM fosfat tampon (pH 7.0).

*In Vitro* Sitotoksisite-MTT İçin:

%90 oranında besi ortamına ve %10 oranında MTT (Sigma, Almanya) stok solusyonu (5mg/ml) içeren MTT ortamı hazırlanmıştır.

Genotoksisite İçin:

Mikronukleus Analizinde Kullanılan Tampon ve Cözeltiler:

KCl: 0.075 M KCl solusyonu hazırlanmıştır.

Fiksatif: Metanol/Asetik asit karışımı, 3:1 oranında hazırlanmıştır.

### 3.1.3. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar

- pHmetre ( Meinsberg Electrode, Almanya )
- Spektrofotometre ( Biosciences- Ultraspec 1100 pro, ABD)
- Hassas terazi ( Mettler Toledo, ABD )
- Işık ölçümleri için kullanılan kuantum metre (Lutron LX 105, ABD)
- Mikroskop ( Olympus CH40) ve Neubauer sayma lamı
- Kabin
- Su banyosu ( Nüve NB20, Türkiye)
- Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Biosan MSH 300, Letonya)
- Vorteks (Biosan Bio Vortex V1, Letonya)
- Sıcaklık ayarlı inkubator dolapları (Uğur, Türkiye)
- Buzdolabı (Vestel RINA 465 HG, Türkiye)
- Desikatör
- Nuche Erleni filtrasyon aparatı (Sartorius, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Eppendorf, Centrifuge 5810 R)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma, Laboratory Centrifuges 4K15C, Almanya)
- İnkubator (Heraeus, Almanya)
- Vertikal akışlı class II kabin (Heraeus, Almanya)

## 3.2. Metot

### 3.2.1. *Spirulina platensis*'in inokulasyonu ve takibi

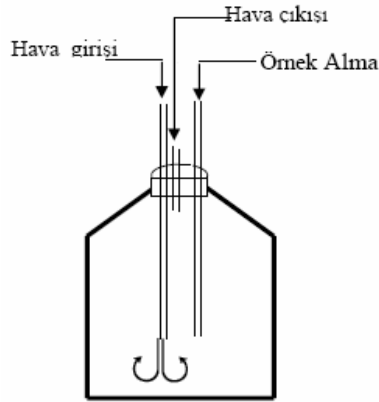
*Spirulina platensis* üretimi başlangıcında denemeler, 3 paralel kültür şeklinde hazırlanmıştır. İnokulum, şekil 3. 1'de görülen 2 L'lik şişelerde (Simax) çalışma hacmi 1,5 L olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

İnokulum, oran olarak Pelizer at al., (2003) belirttiği şekilde 0,15 g kuru ağırlık/L üzerinden yapılmıştır. Şekil 3.2’de görüldüğü gibi üretim, 2000 lüks ışık yoğunluğunda sürekli aydınlatma (Wiselite ESL/H, 20W, 0,175 A, daylight) ve 1 L/dk. havalandırma sağlanarak gerçekleştirilmiştir.

Yapılan 12 günlük üretim boyunca optimum ortam koşulları çizelge 3.2’de görüldüğü gibi kontrol edilmiştir. Kültür morfolojisi mikroskobik (Olympus CH40) olarak incelenmiştir.

**Çizelge 3.2.** *Spirulina platensis* optimum üretim koşulları

<b>Sıcaklık</b>	25°C
<b>pH</b>	9.8-10.0
<b>Işık yoğunluğu</b>	2000 Lüks
<b>Havalandırma</b>	0,66 vvm



**Şekil 3. 1.** Üretimde kullanılan 2L’lik kültür şişeleri



**Şekil 3.2.** *Spirulina platensis*'in kültür şişelerinde havalandırmalı üretimi

Kültürün üremesi ve biyokütle artışı, kuru ağırlık ve spektrofotometrik olarak optik yoğunluk ölçülerek incelenmiştir. Kültürün absorbansı, kültür ortamı kör olarak kullanılarak 750 nm'de ölçülmüştür. Kuru ağırlık ölçümü için ise, kültürden örnek alınarak filtrasyon yapılmıştır. 105 °C'de 2 saat etüvde bekletilerek sabit hacme getirilmiş Whatman GF/C (Whatman glass microfibre filters, 1,2 µm, 47 mm) filtreler kullanılmıştır. Kültürden alınan örnekler, darası alınan filtrelerden süzölmüştür ve tekrar 105 °C'de 2 saat etüvde inkube edilerek sabit hacme gelmesi sağlanmıştır. 2 saat sonunda filtrelerin ağırlıkları alınarak kuru ağırlık hesaplanmıştır.

### 3.2.2. Protein analizi ve fikosiyanin tayini

Protein analizinde modifiye Lowry protein analiz yöntemi kullanılmıştır. Çizelge 3.3'te belirtilen miktarlarda standart BSA çözeltisinden, cam deney tüplerine konulup, destile su ve 1 N'lik NaOH çözeltisinden ilave edilerek standartlar elde edilmiştir. Kültürlerden alınan örneklere 1 N NaOH ilave edilip 5 dakika 100 °C'lik su banyosunda bekletilmiş hemen ardından tüpler soğuk su banyosuna alınarak soğutulmuştur. Reaktif C ilave edilip oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra vortekslenmiştir. Daha sonra reaktif D ilave edilip 20 dakika bekletilerek vorteks ile karıştırılmış, yapılan inkübasyon sonunda 750 nm'de absorbansları spektrofotometre ile okunmuştur.

**Çizelge 3.3.** Protein analizinde kullanılan örnek, standart ve reaktifler

Miktar (mL)	Kör	St1	St2	St3	St4	St5	St6	Örnek
Standart BSA çözeltisi	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	-
Distile Su	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	-
1 N NaOH	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Örnek	-	-	-	-	-	-	-	0,5
Reaktif C	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Reaktif D	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

St: Standart BSA'ların değerleri

### 3.2.2.1. Fikosiyanin miktar tayini

Boussiba and Richmond'un (1979) belirttiği prosedür ile *Spirulina platensis*'ten elde edilen ham ekstrakt ve kuru hücrenin fikosiyanin miktarına bakılmıştır.

- 40 mg *Spirulina* tozu 10 ml santrifüj tüpüne alınıp üzerine 100 mM potasyum-fosfat tamponu eklenmiştir.
- Vortekslenerek etkin bir şekilde karışması sağlanmıştır.
- Buzdolabında bir gece bekletilmiştir.
- Tekrar vortekslenerek karıştırılmıştır.
- 10 °C'de 3200 rpm hızında soğutmalı santrifüjde santrifüjlenmiştir.
- Kör olarak potasyum-fosfat tampon kullanılarak 620 nm spektrofotometrede absorbansı ölçülmüştür.

### 3.2.2.2. Ham ekstraktın elde edilmesi

*Spirulina*'dan ham ekstrakt elde etmek için Minkova et al., (2002) yaptıkları çalışmada fiziksel dondur-çözdür hücre parçalama yöntemini uygulamışlardır. Çalışmalarda aşağıdaki prosedür kullanılmıştır:

- 800 mg kuru ağırlık biyomas 100 mL ekstraksiyon tamponu (0.01 M K-fosfat tamponu, pH 6.7) ile resuspanse edilmiştir.
- Suspansiyon -20 °C'ye konularak dondurulmuştur.
- Dondurulduktan sonra 30 °C'de karıştırılarak çözdürülmüştür.
- +4 °C'de 1 gece bekletilmiştir.
- 13100 g santrifüj (Sigma, Laboratory Centrifuges 4K15C, Almanya) hızında 30 dk. boyunca santrifüj yapılmıştır ve pellet kısım atılarak süpernatant ilerleyen çalışmalarda kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir.



- Sıvı kısmı liyofilize etmek için -86 °C’de bekletilmiştir.
- -86 °C’den alınan materyal liyofilizatöre atılarak dondurarak kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3. Ham ekstrakt dilusyonlarının hazırlanması ve krem ekstraksiyonu**

Krem formülasyonuna ilave edilecek *Spirulina* ham ekstrakt oranını belirlemek amacıyla farklı ekstrakt dilusyonları hazırlanarak sitotoksik etkilerine bakılmıştır:

0,4 g ekstrakt/20 mL vasat = %2 stok

0,2 g ekstrakt/20 mL vasat = %1 stok hazırlanarak aşağıda belirtilen dilusyonlar bu oranlar üzerinden yapılmıştır.

#### Çalışılan konsantrasyonlar:

%1

%0.5

%0.1

%0.05

%0.01

%0.001

%0.0001

Sterilizasyon: % 2’lik ekstrakt solüsyonu önce 0,8µ , daha sonra 0,45 µm por çaplı filtreden geçirilerek aşamalı olarak klarifiye edilmiştir. Daha sonra kabinde 0,2 µ’luk filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Krem viskoz yapıda olduğu için genotoksik çalışmalarda direkt olarak kullanılamamıştır. Bunun için ISO 10993-12 yönetmeliğine uygun

olarak kremin ekstraksiyonu yapılmıştır. Bu prosedüre göre çizelge 3.4’de belirtildiği şekilde, 0.2 g/mL oranında krem kontrol (*Spirulina* ham ekstrakt içermeyen), %0.5 *Spirulina* ham ekstrakt içeren ve %1.125 *Spirulina* ham ekstrakt içeren kremlerin 37 °C etüvde (Heraeus, Almanya) 72 saat inkube edilerek ekstraktları hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.4.** ISO 10993-12’nin belirttiği ekstraksiyon oranları (ISO 10993-12, 1999)

<b>Kalınlık (mm)</b>	<b>Ekstraksiyon Oranı (Yüzey alanı/Hacim) ± 10%</b>	<b>Örnek Materyaller</b>
< 0.5	6 cm <sup>2</sup> /ml	Metal, sentetik polimer, seramik, kompozit film, tabaka/levha
0.5 - 1.0	3 cm <sup>2</sup> /ml	Metal, sentetik polimer, seramik, kompozit film, plaka, kalıplanmış madde
> 1.0	1.25 cm <sup>2</sup> /ml	Doğal elastomerler
Düzensiz	0.2 g örnek/ml, 6 cm <sup>2</sup> /ml	Toz, peletler, köpük, vb.

Ekstraksiyon oranı: Test maddesinin ağırlığı/ Ekstraktant hacmi

Ekstraksiyon Koşulları: 37°C-72 saat.

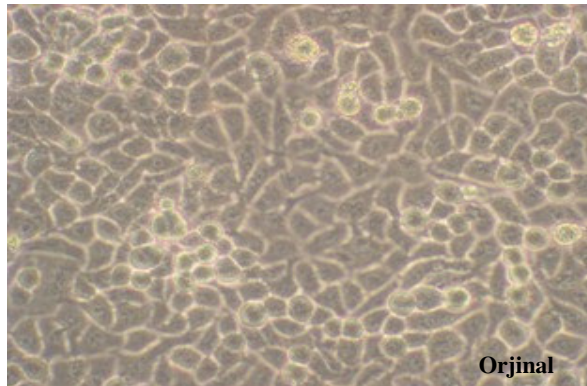
Bu koşullarda ekstraksiyonu hazırlanan kremler, 3000 g soğutmalı santrifüj ile (Sigma, Laboratory Centrifuges 4K15C, Almanya) 10 °C’de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Pelet uzaklaştırılmış, süpernatant alınarak sterillemiştir.

**Krem Ekstraktlarının Sterilizasyonu:** Krem ekstraktları önce 0,8 $\mu$ , daha sonra 0,45  $\mu$ 'luk filtreden geçirilerek aşamalı olarak klarifiye edilmiştir. Daha sonra kabinde 0,2  $\mu$ m por çaplı filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

### 3.2.4. *In vitro* sitotoksosite testi-MTT

**Ham Ekstraktların Sitotoksosite Denemesi:**

HS<sub>2</sub> keratinosit hücre hattı -86 °C' den çıkarılarak çözdürülmüştür ve DMEM/F12 hücre besi ortamı ile flaska aktarılmıştır. HS<sub>2</sub> hücre hattı karbondioksite ihtiyaç duyan hücre tipi olduğundan 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir (Şekil 3.3). Bu şekilde çalışma için hazırlanan hücreler sayılarak 96 gözlü pleytlere ekimi yapılmıştır ve hücrelerin yüzeye tutunabilmesi için 3 saat 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkubasyona bırakılmıştır. Tutunma aşamasından sonra normal vasat çekilerek 200  $\mu$ L ekstraktlı vasatlar eklenmiştir. 1, 3 ve 7 gün sürelerle 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub> li etüvde inkube edildikten sonra MTT uygulanmıştır.



**Şekil 3.3.** 48 saatlik HS2 hücre hattının 25 cm<sup>2</sup> flastaki görüntüsü

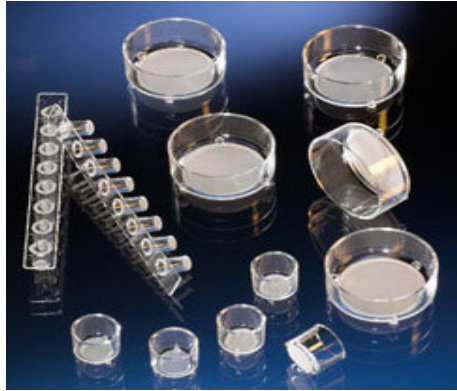
### Ham Ekstraktın MTT Uygulaması:

Hücreler ekstraktlı vasatla 1. gün, 3. gün ve 7. gün etkileştirildikten sonra ekstraktlı vasat dökülüp 200µl MTT vasatı eklenmiştir. 4 saatlik inkübasyondan sonra MTT’li vasat dökülerek oluşan formazan kristallerini çözmek için DMSO eklenmiştir ve kolorimetrik okuyucuda 570 nm’de okutulmuştur.

### Kremin Sitotoksisite Denemesi:

Dalan A.Ş. tarafından gönderilmiş olan ham ekstrakt içermeyen kontrol kremi ile %0.50 ham ekstrakt konsantrasyonuna sahip cilt kreminin hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir.

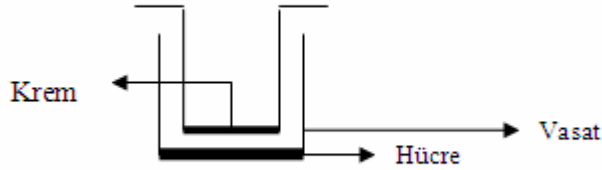
Krem, yüksek viskoziteye sahip olması nedeniyle hücre kültürü pleytleri üzerine direkt olarak ilave edilememiştir. Etkileşimi sağlamak amacıyla Şekil 3.4’de görülen hücre kültürü insertleri (Nunc, Almanya) kullanılmıştır.



Şekil 3.4. 24 gözlü pleyte uygun hücre kültürü insertleri

24 gözlü pleytlerin en alt tabakasına HS<sub>2</sub> keratinosit hücre ekilmiş, pleytin gözüne yerleştirilen insertin üzerine de 200 µL krem

konulmuştur. *Insert* ile pleyt arasındaki boşluğa da 600 µL vasat eklenmiştir. Etkileşim şekil 3.5'te görüldüğü şekilde gerçekleşmiştir.



**Şekil 3.5.** Insertler ile cilt kremi sitotoksosite denemesi

-86 °C'den çıkarılan HS<sub>2</sub> keratinosit hücre hattı çözdürülmüştür ve DMEM/F12 hücre besisi ortamı ile flaska aktarılmıştır. Bu şekilde çalışma için hazırlanan hücreler sayılarak 24 gözlü pleytlere ekimi yapılmıştır ve hücrelerin yüzeye tutunabilmesi için 3 saat 37 °C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkubasyona bırakılmıştır. Tutunma aşamasından sonra vasat çekilerek *insert*ler yerleştirilmiş ve *insert*lerin üzerine de 200 µL cilt kremi dikkatli bir şekilde yayılmıştır. Hücreler bu şekilde 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde, 24 saat, 72 saat ve 7 gün boyunca krem ile etkileşime tabi tutulmuştur. Bu süreler tamamlandıktan sonra MTT uygulanmıştır.

#### Kremin MTT Uygulaması:

Hücreler bu şekilde 1. gün, 3. gün ve 7. gün etkileştirildikten sonra cilt kremi içeren insertler uzaklaştırılarak MTT'li vasat eklenmiştir. 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde 4 saatlik inkübasyondan sonra MTT'li vasat dökülerek oluşan formazan kristallerini çözmek için DMSO eklenmiştir ve spektrofotometrede 570 nm'de okutulmuştur.

### 3.2.5. *In vitro* yara iyileşmesi

HS<sub>2</sub> keratinosit ve HEP 299 hücre hatları, -86 °C'den çıkarılarak çözdürülmüştür ve DMEM/F12 hücre besi ortamı ile flaska aktarılmıştır. 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir.

Yara iyileşmesi denemesi 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

#### I. Aşama: HEP 299 fibroblastların ekimi

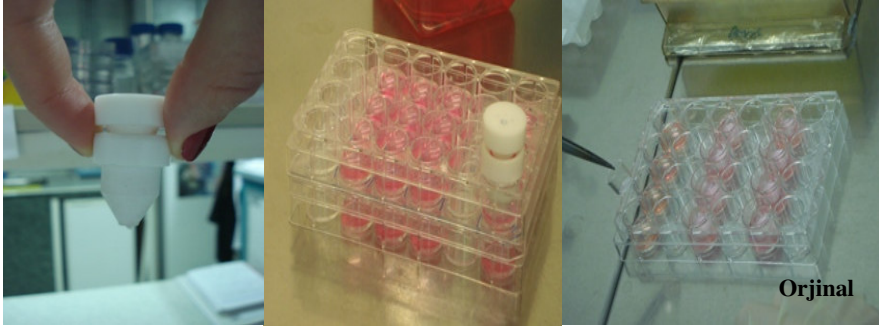
25 cm<sup>2</sup> flaskta üremiş olan HEP 299 fibroblast hücre hattı tripsin/EDTA (Sigma) solusyonu ile kaldırılmıştır. 25 cm<sup>2</sup> flaskta hücreler, 24 gözlü pleytlere aktarılmış ve hücreler 37 °C, CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır.

Başlangıç hücre konsantrasyonu için hücre sayımı yapılmıştır.

$$x_0 = 300 \cdot 5 \cdot 10^4 / 9 = 1,66 \cdot 10^6 \text{ hücre/mL}$$

#### II. Aşama: Yaranın açılması

3 saat boyunca tutunmuş olan fibroblast hücreleri üzerine önceden otoklavlanarak sterilize edilmiş olan Ege Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Arkan ve ark. tarafından geliştirilen 24 gözlü pleyt için uygun yara oluşturma aparatı ile yaralar açılmıştır (Şekil 3.6) (Arkan vd., 2007). Böylelikle her gözde homojen yaralar açılması sağlanmıştır. Yara oluştururken kalkan hücreleri uzaklaştırmak için vasat yenilenmiştir.



**Şekil 3.6.** Yara oluşturma aparatı ve 24 gözlü pleytler üzerinde yaraların açılma aşaması

### III. Aşama: Epitellerin Ekilmesi

25 cm<sup>2</sup> flastaktaki HS<sub>2</sub> epitel hücrelerin vasatı boşaltılıp tripsin/EDTA solusyonu eklenerek hücreler kaldırılmıştır.

Kaldırılan hücreler, +4°C soğutmalı santrifüjde (Eppendorf, Centrifuge 5810 R, Almanya) 800 rpm/5 dk santrifüjlenmiştir. Insertler gözlere yerleştirilmiştir. 5 dakika sonunda süpernatant dökülüp hücreler homojenize edilerek vasat ile homojenize edilmiştir. Her bir insert üzerine 0.5 mL/göz olacak şekilde hücreli vasat eklenerek hücreler tutunmaya bırakılmıştır.

$$x_0 = 85 * 5 * 10^4 / 9 = 4.7 * 10^5 \text{ hücre/mL}$$

### IV. Aşama: Kremin Konulması

HS<sub>2</sub> keratinosit hücreler insert membranının üzerine tutunduktan sonra, insertlerin üzerine 200 µL cilt kremi dikkatli bir şekilde yayılmıştır. Hücreler bu şekilde 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde, 7 ve 14 gün boyunca krem ile etkileşime tabi tutulmuştur. Bu süreler tamamlandıktan sonra Giemsa boyama yapılmıştır.

- Hücreler, kollajen artışının incelenmesi amacıyla immunhistokimya çalışması için Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi'ne gönderildi.

#### Immunhistokimya 'da Uygulanan Prosedür:

Hücreler %4 lük paraformaldehit ile 30 dk. fikse edildikten sonra 3 kez 5 dk. PBS (Phosphate buffer solution) ile yıkandı. %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (1 08600, Merck, Darmstadt, Almanya) uygulandı (5 dk) ve 3 defa PBS ile yıkandı. Permeabilizasyon için %0.1'lik Triton-X 100 ile 15 dk inkübe edildikten sonra 3 defa PBS ile yıkandı. 1 saat bloking uygulamasından sonra direkt olarak anti-collagen 1 (GTX 41285, GeneTex) antikoru ile 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra ikincil antikolar biotinlayted IgG (30 dk) ve ardından streptavidin (30 dk) (SentiTek HRP Anti-Polyvalent, SHP125, Skytek) uygulandı. İki uygulama arasında ve son uygulamadan sonra 3 defa PBS ile yıkamalar yapıldı. DAB kromojeni uygulanarak immunoreaktivitelerin görünürlüğü sağlandı. Distile su ile yıkandıktan sonra lameller çıkartılarak kapatma mediumu ile kaplanarak kapatıldı. Örnekler ışık mikroskopunda (BX40 Olympus) incelendi.



### 3.2.6. Mikronukleus analizi

Bu çalışmada, gönüllü olan sağlıklı bireylerden alınan kanlar kullanılarak RPMI 1640 vasat ile periferik kan kültürü hazırlanmıştır. Mikronukleus analizi için hücre kontrol, mitomisin C kontrol, krem kontrol, %0.5 ham ekstrakt içeren krem ve %1.125 ham ekstrakt içeren krem ile çalışılmış ve her bir test grubu üçer tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır.

Mikronukleus analiz protokolü aşağıdaki gibidir (Çizelge 3.5):

- 1) Gönüllüden heparinli tüp kullanılarak yaklaşık 2 ml kan örneği alınmıştır.
- 2) Hazırlanan hücre kültürü ortamı 5'er ml'lik yatık tüplere (Nunc, Almanya) bölünerek her bir tüpe 0.4 ml kan + 4.6 mL vasat + 50 µL fitohemaglutin (PHA, Biochrom, Almanya) eklenmiştir.
- 3) Tüpler 37°C inkübatörde 72 saat boyunca kültüre edilmiştir.
- 4) Kültür başlangıcından 24 saat sonra ortama krem ekstraktları + PHA ilave edilmiştir. Mitomisin C ve hücre kontrol tüplerine de RPMI 1640 vasat + PHA eklenmiştir. Aynı zamanda pozitif kontrol olarak final konsantrasyonu 0.10 µg/ml olacak şekilde mitomisin C, (Applichem, Almanya) 10 µg/ml'lik stok solusyonundan 100 µl alınarak mitomisin C tüplerine eklenmiştir.
- 5) Sabah, öğle, akşam tüpler birer kez çalkalanarak homojenizasyon sağlanmıştır.
- 6) 44. saatte sitokalsin B (Sigma, Almanya) eklemesi yapılmıştır. Son olarak ml'de 6 µg sitokalsin B (Anonymous, 2004) olacak şekilde 10 ml'lik tüplere 2000 µg/ml stok solusyonundan 30 µl ilave edilmiştir.

7) Kùltür süresi bitiminde 72. saatte tüpler inkübatörden çıkarıldılar.

8) 10 dk. boyunca 1000 rpm'de santrifüj edildiler. Santrifüj bitiminden sonra konik kısma kadar olan (yaklaşık 0.5 mL) süpernatant pastör pipeti ile atılmıştır. Kalan pelet homojenize edilmiştir. Hipotonik KCl solüsyonundan (0.075M KCl önceden 4°C'ye soğutuldu) yaklaşık 8 mL damla damla hücrelerin şişmesi için vorteks eşliğinde eklenmiştir. 10 dk. boyunca tüpler buzdolabında inkube edilmiştir.

9) Süre sonunda tüpler tekrar santrifüj edilmiştir. Üst kısım atılarak tekrar damla damla soğuk metanol:asetik asit (3:1) fiksatifinden yaklaşık 8 mL her tüpe vorteks ile karıştırılarak eklenmiştir. Tüpler, 1. fiksatif eklemesinden sonra 15 dk. buzdolabında bekletilmiştir.

10) Sonra tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem (fiksatif aşaması) iki kez daha yapılmıştır, her işlemden sonra tüpler 5'er dk. buzdolabında bekletilmiştir. 3. fiksatife hücrelerin bozulmadan kalması için %1'lik formaldehitten (Merck, Almanya) 3-4 damla eklenmiştir.

11) Son fiksatiften sonra tüplerin konik kısma kadar olan (yaklaşık 0.5 mL) süpernatant atılmıştır. Kalan kısım yaklaşık 0.5 ml olup pastör pipeti ile homojen hale getirilmiştir.

12) 5-10 cm yükseklikten 5-6 damla yavaşça daha önceden steril edilmiş ve alkolde bekletilen soğuk lamlara eğik tutularak damlatılarak yaymaları yapıldı.

13) Yaklaşık 10 dk. bekletilerek kurutulduktan sonra %5'lik giemsa (Applichem, Almanya) 30 dk. boyanmıştır.

14) Hazırlanan preparatlar lamel ile kapatılarak uzun süreli saklamaya uygun hale getirilmiş ve mikroskopik analizleri yapılmıştır.

**Çizelge 3.5.** Mikronukleus analizi sırasında yapılan işlemler

<b>Örnek ve Saatler</b>	<b>Mikronukleus Analizi-Yapılan İşlemler</b>
0.saat	Alınan kandan tüplere RPMI vasat+kan+PHA eklenmiştir.
24.saat	Hücre kontrol tüpüne vasat+PHA, Krem ekstraktı içeren tüplere ekstrakt+PHA eklenmiştir. Mitomisin C tüpüne vasat+PHA+ mitomisin C eklenmiştir.
44.saat	Sitokalsin B eklenmiştir.
72.saat	KCl ve fiksatif eklemesi yapılmıştır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. *Spirulina platensis* Büyüme Eğrisi

*Spirulina platensis*'in 15 gün boyunca kontrollü laboratuvar koşullarında üretimi yapılmıştır. Üretim sırasında kültür artışı, kuru ağırlık ve optik dansite ölçümü ile takip edilmiştir. Mikroskobik analizler ile kültürün morfolojisi ve büyümesi incelenmiştir. Denemelerde spesifik büyüme hızlarının ve ikilenme sürelerinin hesaplamaları aşağıdaki formüle göre yapılmıştır (Becker, 1995) .

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{\Delta t} \quad D.T = \frac{\ln 2}{\mu}$$

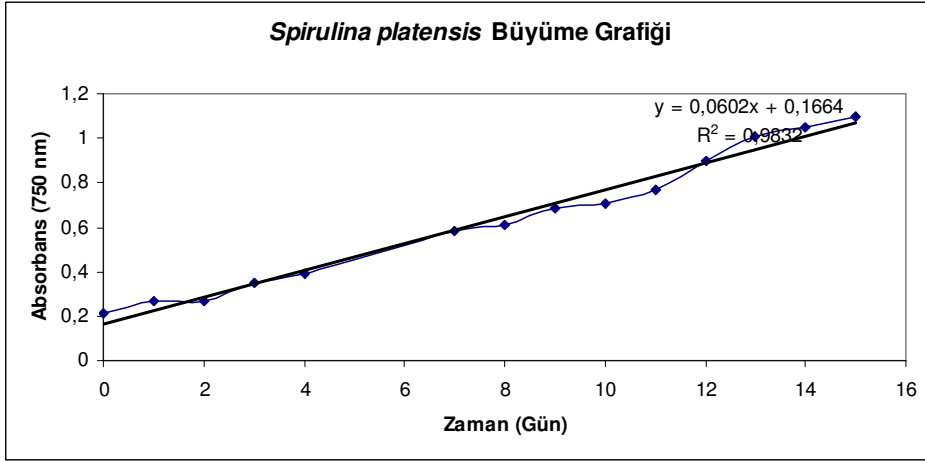
$\mu$  ; Spesifik büyüme hızı

$x_2$  ;  $t_2$  zamanındaki hücre konsantrasyonu

$x_1$  ;  $t_1$  zamanındaki hücre konsantrasyonu

$\Delta t = t_2 - t_1$

D.T. ; İkilenme süresi



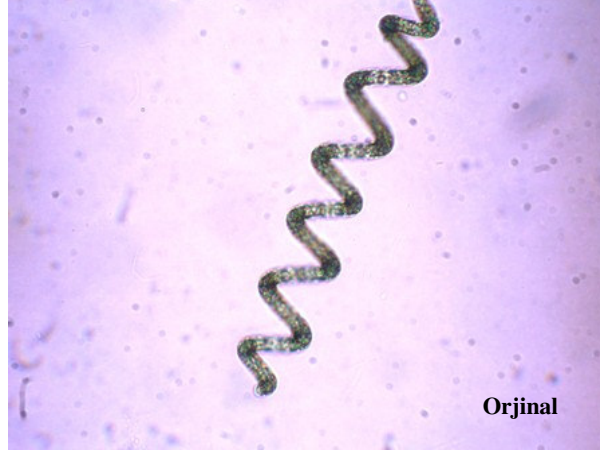
**Şekil 4.1.** *Spirulina platensis*'in 15 günlük üretim sonucunda elde edilen büyüme eğrisi

Başlangıç inokulum konsantrasyonu olarak Pelizer et al., (2003) bildirdiği gibi 0.15 g/L kullanılmıştır. Biyokütle verimi ve ekonomik kültürü açısından inokulum konsantrasyonunun optimum olması gerekmektedir. Çok düşük başlangıç konsantrasyonları, diğer algal türler tarafından kontaminasyona veya fotoksidasyon nedeniyle kayıplara neden olabilmektedir. Çok yüksek başlangıç konsantrasyonları ise, gölgeleme ile ışığın etkin kullanılamamasına neden olabilir (Becker, 1982). Ayrıca inokulum, logaritmik fazdaki genç kültürden yapılmıştır. Bu nedenle inokulumu takiben üreme evresindeki hücreler, şekil 4.1'de de görüldüğü gibi 1. ve 2. günler arasında kısa bir lag (uyum) fazı geçirmiştir. Üreme daha sonra logaritmik bir şekilde devam etmiştir.

Bu koşullar altında 15 gün boyunca üretimi gerçekleştirilen *Spirulina platensis*'in spesifik büyüme hızı,  $\mu$ , 0,154 gün<sup>-1</sup>, ikilenme süresi ise 2,7 gün olmuştur.

Optimum kültür koşulları altında *Spirulina platensis* hücreleri şekil 4.2'de görüldüğü gibi spiral bir morfolojiye sahiptir. Optimum kültür koşullarının dışına çıkıldığında (yüksek ışık ve sıcaklık gibi stres

koşulları altında) hücrelerin kıvrımlı yapısında bozulmalar meydana gelmekte ve kültürler uzun süre bu koşullara maruz kaldığında yapısında düzleşmeler görülmektedir.

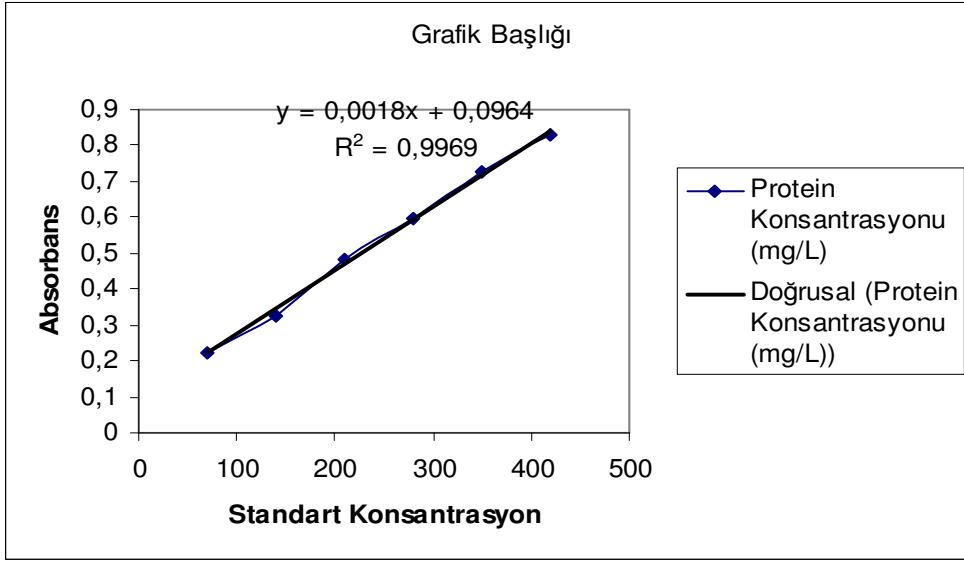


**Şekil 4.2.** *Spirulina platensis*'in 15 günlük üretim sırasında çekilmiş olan mikroskopik görüntüsü (x200)

## 4.2. Protein Miktarı ve Fikosiyanin İçeriği

*Spirulina platensis*'in laboratuvar koşullarında üretimi sonucunda protein ve fikosiyanin miktarlarına bakılmıştır. Modifiye Lowry protein analizi sonucu şekil 4.3'te görülen standart grafiği elde edilmiştir. Bu standart eğriden yola çıkılarak üretim sonucu biyokütlenin sahip olduğu protein miktarı belirlenmiştir. Üretim sırasında koşullar sabit olduğundan standart veriler elde edilmiştir. *Spirulina platensis* yüksek protein ve fikosiyanin içeriğiyle bilinmektedir. Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere kuru ağırlığının yaklaşık yarısı kadar protein içermektedir. Literatürde biyokütlesinin %55-70 oranında protein içerdiği bildirilmektedir. Oliveira ve ark. (1999), yaptıkları bir çalışmada ise laboratuvar koşullarında *S.platensis*'in %40-60 oranında protein içeriğine sahip

olduğu bildirilmiştir. Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi kontrollü koşullarda yapılan üretim sonucu, kuru ağırlığının % 7’si kadar fikosiyanın içerdiği saptanmıştır. Ham ekstrakttaki fikosiyanın miktarı ise % 4.5 olarak belirlenmiştir.



şekil 4.3. Modifiye Lowry Standart Grafiği

Çizelge 4.1. *Spirulina platensis* modifiye Lowry yöntemine göre protein miktarı

Organizma	Protein Miktarı (g/L)	Kuru Ağırlık (g/L)	Protein (%)
<i>Spirulina platensis</i>	1.6	4.0	40
<i>Spirulina platensis</i> -Ham ekstrakt	0.5	4.0	12.5

% ham fikosiyanin miktarının belirlenmesinde;

$$\frac{A_{620} \times (10) \times (100)}{3.39 \times (\text{mg örnek}) \times (\% \text{ kuru ağırlık})}$$

$$3.39 \times (\text{mg örnek}) \times (\% \text{ kuru ağırlık})$$

formülü kullanılmıştır. 3,39 ekstinksiyon katsayısıdır (Boussiba and Richmond, 1979).

**Çizelge 4.2.** *Spirulina platensis* fikosiyanin miktarı

<b>Materyal</b>	<b>Fikosiyanin Miktarı (mg/mL)</b>	<b>Kuru Ağırlık (mg/mL)</b>	<b>Fikosiyanin Miktarı (%)</b>
<i>Spirulina platensis</i> -Ham ekstrakt	0.18	4	4.5
<i>Spirulina platensis</i> -Kuru hücre	0.28	4	7

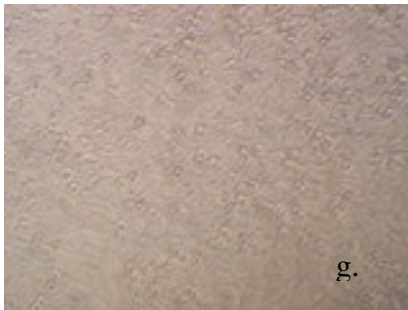
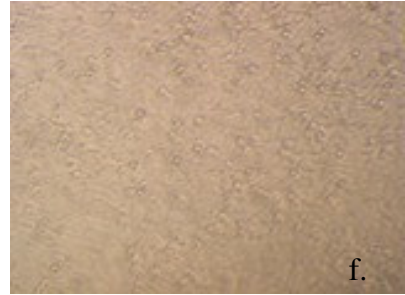
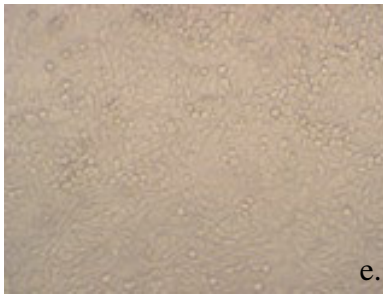
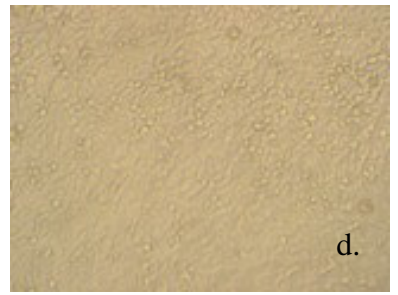
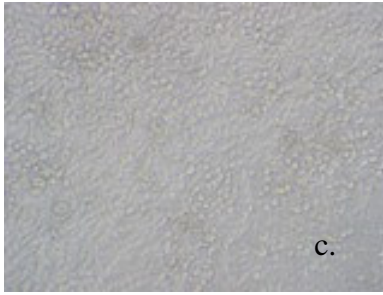
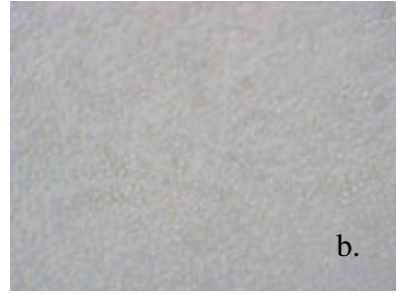


### **4.3. In Vitro Sitotoksitate Testleri-MTT**

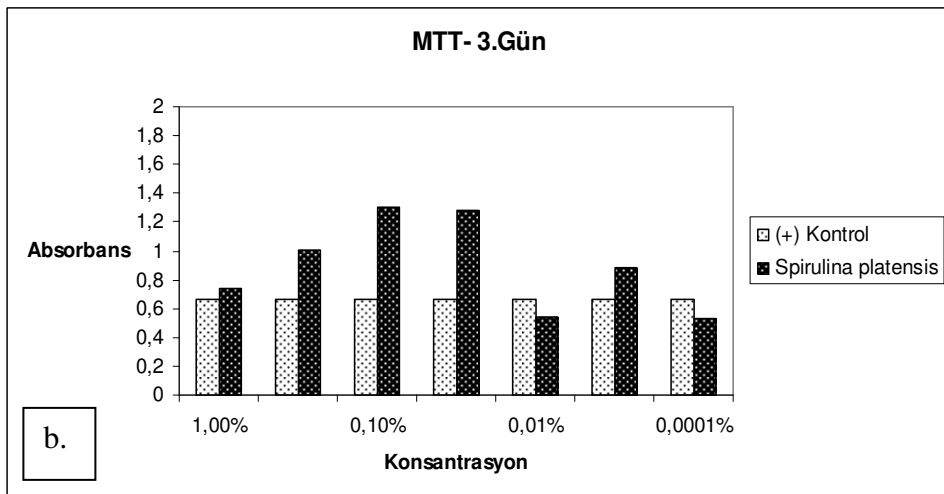
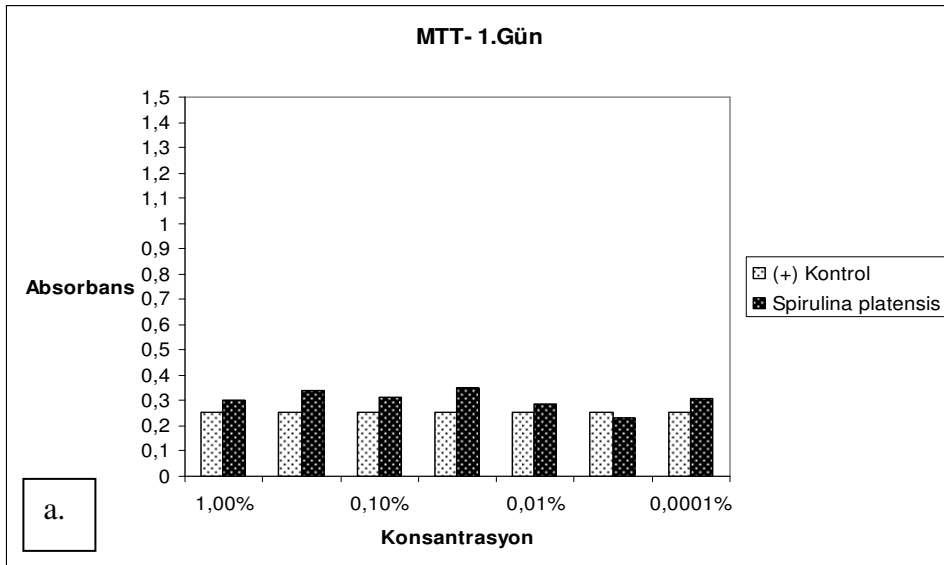
#### **4.3.1. Ham ekstraktların MTT sonuçları**

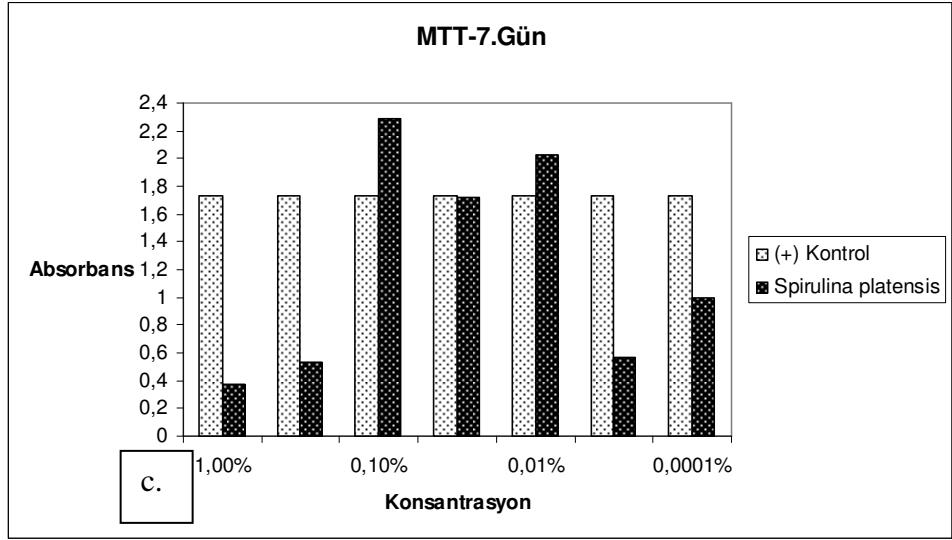
Geliştirilecek olan krem denemelerinden önce *Spirulina platensis*'ten elde edilen ham ekstraktın farklı dilusyonları kullanılarak sitotoksitate çalışmaları gerçekleştirilmiştir. DMEM/F12 besi ortamı ile hazırlanan %1.25, %1, %0.75, %0.50, %0.1, %0.05, %0.01, %0.001, %0.0001 dilusyonlar, kendi içinde de 3 tekrarlı olmak suretiyle 3 seri şeklinde denenmiştir. 1, 3 ve 7 gün olmak üzere farklı sürelerle 37 °C'de % 5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkube edilmişlerdir. İnkubasyon süresi sonunda hem mikroskopik olarak hücre morfolojileri incelenmiş hem de MTT testi ile hücreler üzerindeki sitotoksik etki belirlenmiştir. Kendi içinde 3 tekrarın ortalamaları alınarak her bir setin absorbans değerleri belirlenmiştir.

Şekil 4.4'te HS<sub>2</sub> keratinosit hücrelerinin farklı ham ekstrakt oranlarıyla muamelesi sonucu morfolojileri görülmektedir. Şekil 4.5'te ham ekstraktların farklı dilusyonlarının MTT sonucu elde edilen değerleri ve grafikleri yer almaktadır. Şekil 4.6'da ise, MTT testi ile elde edilen % canlılık değerleri ve hücre üremesi üzerindeki etkileri görülmektedir.

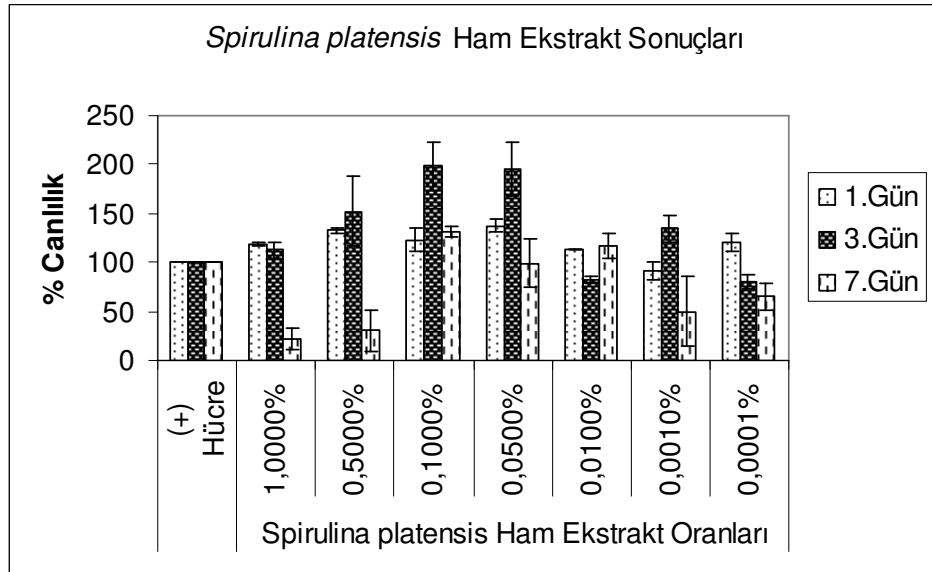


**Şekil 4.4.** HS<sub>2</sub> keratinosit hücrelerinin farklı ham ekstrakt oranlarıyla muamelesi sonucu morfolojik görünümleri





**Şekil 4.5.** HS<sub>2</sub> keratinosit hücre hattı ile a.1, b.3 ve c.7 gün sürelerle inkube edilen ekstraktların MTT sonuçları



**Şekil 4.6.** HS<sub>2</sub> keratinosit hücre hattı ile 1, 3 ve 7 gün sürelerle inkube edilen ekstraktların MTT sonuçlarına göre % canlılık oranları

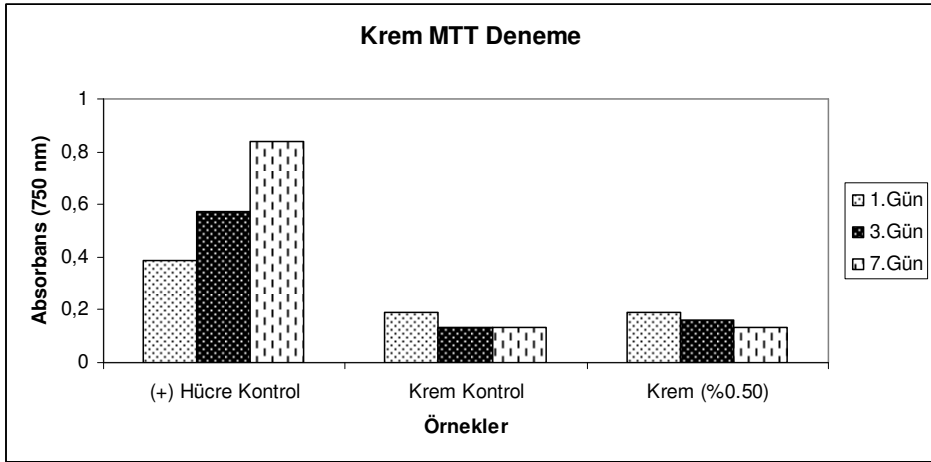
*Spirulina platensis*'ten elde edilen ham ekstrakt inkubasyon süresi boyunca üremeyi stimule edici etki göstermiştir. *In vitro* koşullarda ham ekstraktların HS<sub>2</sub> hattı ile etkileşimi, 1 günlük inkubasyonda tam olarak gerçekleşmemiş, 3.günde etkisini göstermiştir. Hücreler 7 gün süresince inkube edildiğinde ise, fazla oranda üreme nedeniyle pleytte yeterli yer kalmadığı için hücreler yavaş yavaş dökülmeye başlamıştır. 7. gün sonuçlarının düşük çıkmasının nedeninin sitotoksiteden değil de bu durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumda grafikten de anlaşılacağı üzere, 7. güne göre 1. ve 3. gün sonuçları anlamlıdır. Farklı sürelerle yapılan MTT testine göre, sitotoksitate değil aksine hücrelerin proliferasyonunu stimule eden bir etki söz konusudur. Elde edilen sonuçlara göre en iyi sonucu veren konsantrasyonların sıralaması % 0,1 > 0,05 > 0,5 > 0,01 şeklinde yapılabilir. Her bir inkubasyon süresi için hücrelerin üremesini en fazla oranda stimule eden, en iyi konsantrasyonun %0,1'lik ham ekstrakt konsantrasyonu olduğu gözlenmiştir.

*In vivo*'da canlının sahip olduğu bariyerler ve savunma mekanizması gibi dirençler *in vitro* koşullarda hücrelerde bulunmamaktadır. *In vitro* metabolik stabilite, sadece hedef hücrenin aktivitesine bağlıdır. *In vivo* sistemik dağılım, maddeyi farklı dokuların etkisi altında yerleştirebilir. Özellikle karaciğer enzimleri bazı bileşenleri aktive ederken bazılarını inaktive etmektedir. Vasküler endotelyum, kalınlık ve doku kompleksliği nedeniyle permeabilite limitasyonları *in vivo*'da oldukça farklı olabilmektedir (Freshney, 2001). Bu nedenle *in vitro*'da elde edilen bu değerler *in vivo*'da daha yüksek oranlarda aynı etkiyi göstermektedir. Sitotoksitate ve canlılık testi için çeşitli metotlar kullanılmasına rağmen *in vitro* sensitivite ve *in vivo* cevaplar arasında bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Masters, 2000). *In vitro* ve *in vivo* yapılan farklı çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre yaklaşık 10 kat fark olduğu öngörülmüştür. Bu nedenle geliştirilen cilt kremi

formulasyonuna %0.5 ve %1.125 oranında ham ekstrakt ilave edilmesi düşünülmüştür. Bu oranlar ile hazırlanan cilt kremlerinin sitotoksosite testleri yapılmıştır.

### 4.3.2. Cilt Kremleri MTT Sonuçları

%100 doğal hammaddeler ile hazırlanmış olan cilt kremlerinin, hücre kültürü *insert*leri kullanılarak sitotoksosite testleri yapılmıştır. Bu denemeler sırasında olası etkinin kremin kendi formulasyonundan mı yoksa ham ekstraktan mı kaynaklandığını kontrol edebilmek için *Spirulina* ham ekstrakt içermeyen krem kontrol krem olarak kullanılmış ve %0.5 oranında ham ekstrakt içeren cilt kreminin *in vitro* sitotoksosite testleri yapılmıştır.



**Şekil 4.7.** %0.50 oranında *Spirulina* ham ekstrakt içeren cilt kreminin HS<sub>2</sub> keratinosit hücre kültürleri üzerindeki sitotoksik etkisi.

Yapılan bu denemelerin sonucu Şekil 4.7'de açıkça görülmektedir. Sonuçlardan da anlaşıldığı üzere cilt kreminin kendi formulasyonundan kaynaklanan bir sitotoksik etki söz konusudur.

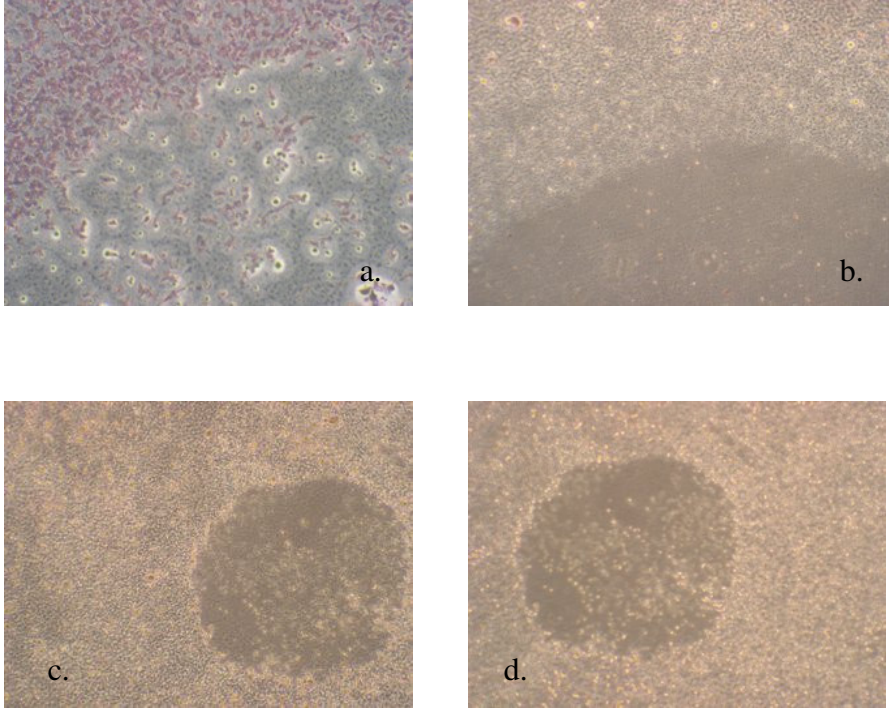
Cilt kremleri ile yapılan denemede, cilt kremlerinin (+) hücre kontrol grubuna göre %50'den fazla oranda toksik etki gösterdiği bulunmuştur.

Cilt kremi formülasyonunda yer alan hammaddelerin teker teker sitotoksiteleri incelenmiş ve kremin bileşenlerinden kaynaklanan herhangi bir etkinin olmadığı bulunmuştur. Bunun nedeni; *in vitro*'da bir deri modeli oluşturulamamış olması ve hücrelerin insert membranı aracılığıyla krem ile direk temasta bulunmasıdır.

Buradan yola çıkarak, bir sonraki deneme olan *in vitro* yara iyileşmesi testinde insert membranının üzerine HS<sub>2</sub> epitel hücreler, pleytin alt kısmına da HEP299 fibroblastik hücreler ekilerek *in vitro* deri modeli taklit edilmeye çalışılmıştır. Böylelikle krem, önce epitel hücrelerden daha sonra da membrandan penetre olarak alt tabakadaki fibroblast hücreler üzerine etki etmiştir.

#### **4.4. *In Vitro* Yara İyileşmesi Testi**

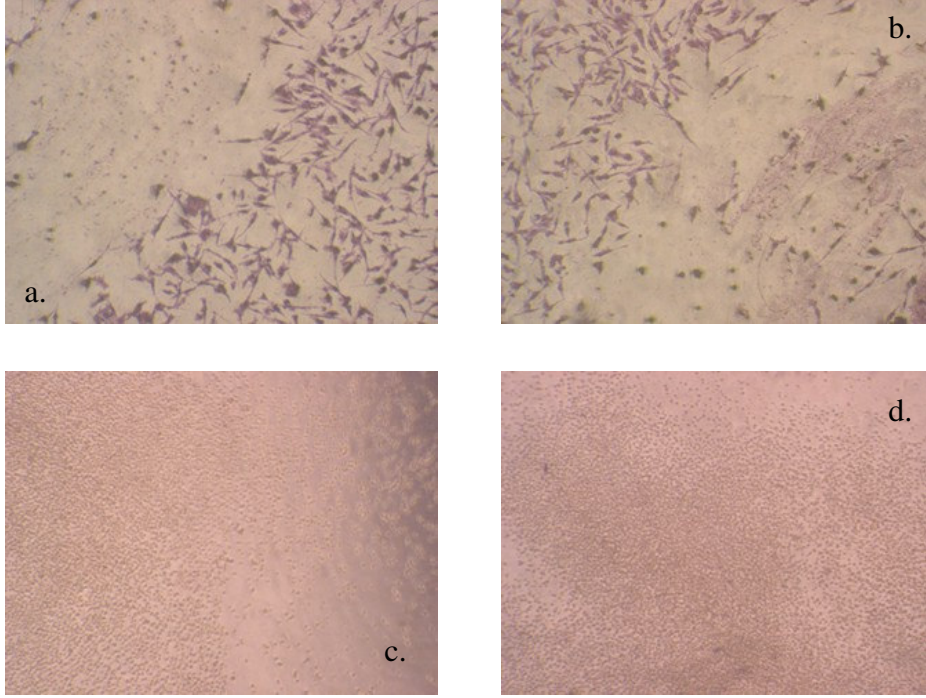
*Spirulina* ham ekstrakt içermeyen kontrol krem, %0.5 *Spirulina* ham ekstrakt içeren ve %1.125 oranında *Spirulina* ham ekstrakt içeren cilt kremlerinin, fibroblast ve keratinosit hücreler ile çift tabaka oluşturularak *in vitro* yara iyileşmesi denemesi yapılmıştır. Bu deneme 3 seri şeklinde tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçların birbirleri ile paralellik gösterdiği gözlenmiştir. Açılan yaralar, 7 gün ve 14 gün sürelerle inkubasyona bırakılmıştır. Şekil 4.8 a,b,c,d ve şekil 4.9 a,b,c,d'de açılan yaraların iyileşme oranları görülmektedir.

Yara İyileşmesi-I.Deneme-7.Gün

**Şekil 4.8.** 7.gün sonunda a. Hücre kontrol, b. Krem kontrol, c., d. %0.5 ham ekstrakt içeren cilt kremi-Açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri



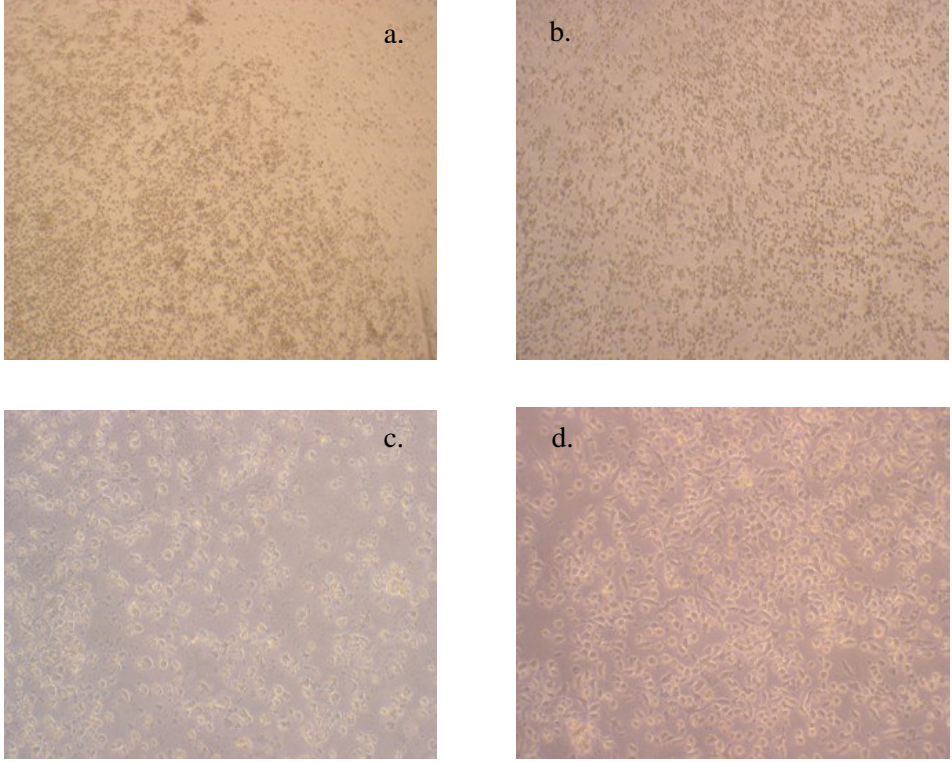
### Yara İyileşmesi-I.Deneme-14.Gün



**Şekil 4.9.** a.,b. Hücre kontrol, c. Krem kontrol, d. %0.5 ham ekstrakt içeren cilt kremi- Açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri

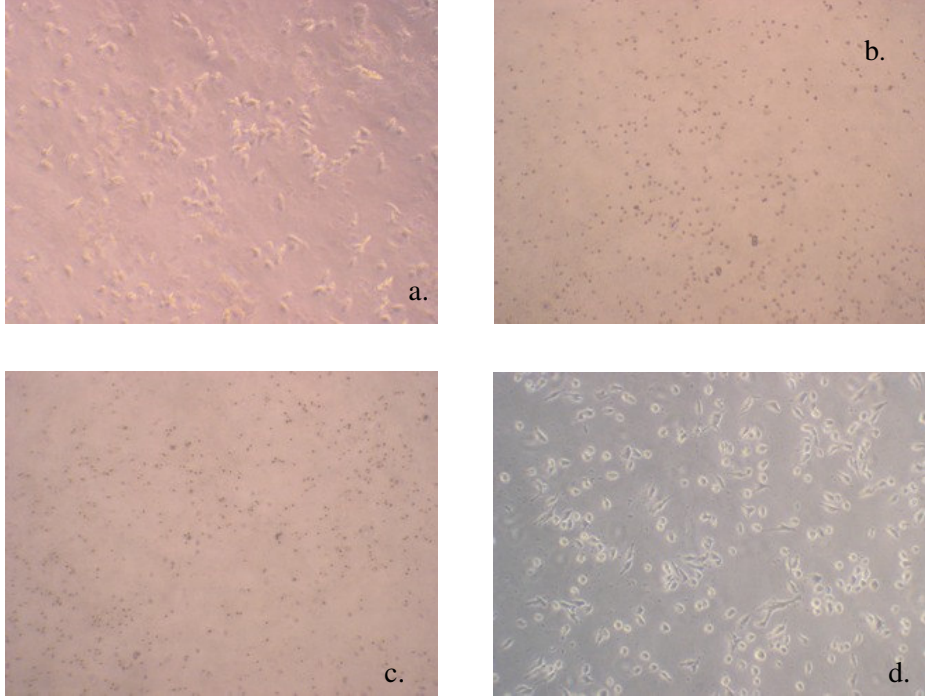
İlk denemede elde ettiğimiz sonuçlara göre, 7 ve 14. günde geliştirilen cilt kremlerinin yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği ancak *Spirulina* ham ekstraktı içeren cilt kremlerinin hücre proliferasyonunu ve yara iyileşmesini daha fazla oranda arttırdığı gözlenmiştir.

Kremin yağ bazlı olması hücrelerin boyanmasına engel teşkil etmiştir ve bu nedenle hücreler, boyama öncesi gözlemlenip hücre göçleri ve yara iyileşmeleri incelenmiştir. İyileşme 7.günde daha belirgin bir şekilde görülebilmektedir (Şekil 4.10-4.11).

Yara İyileşmesi-II.Deneme-7.Gün

**Şekil 4.10.** 7.günde a.hücre kontrol, b.krem kontrol, c.%0.5 ham ekstrakt içeren d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kreminde açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri

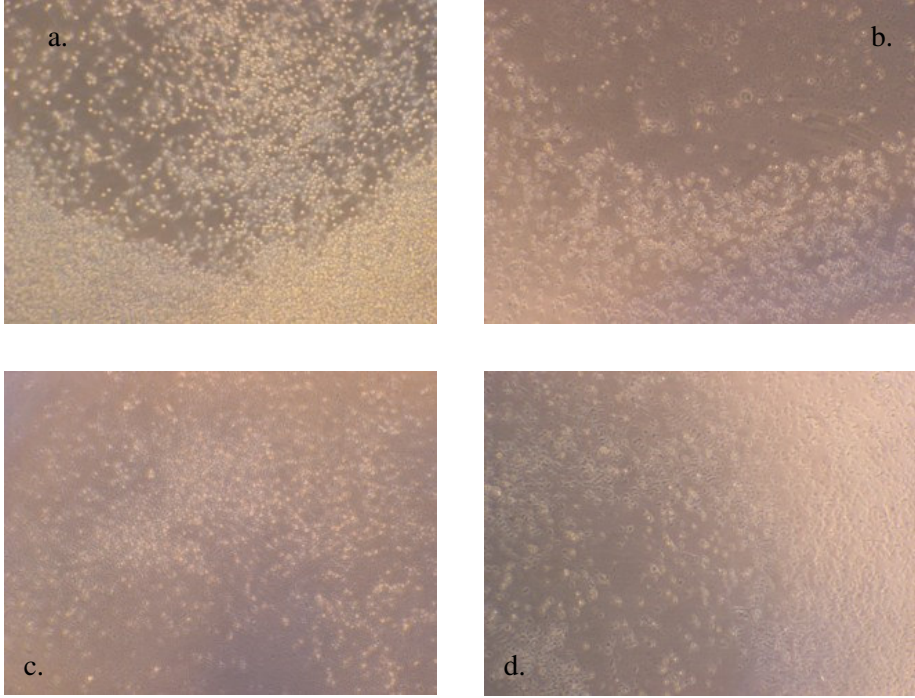
### Yara İyileşmesi-II.Deneme-14.Gün



**Şekil 4.11.** 14.günde a.hücre kontrol, b.krem kontrol, c.%0.5 ham ekstrakt içeren d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kreminde açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri

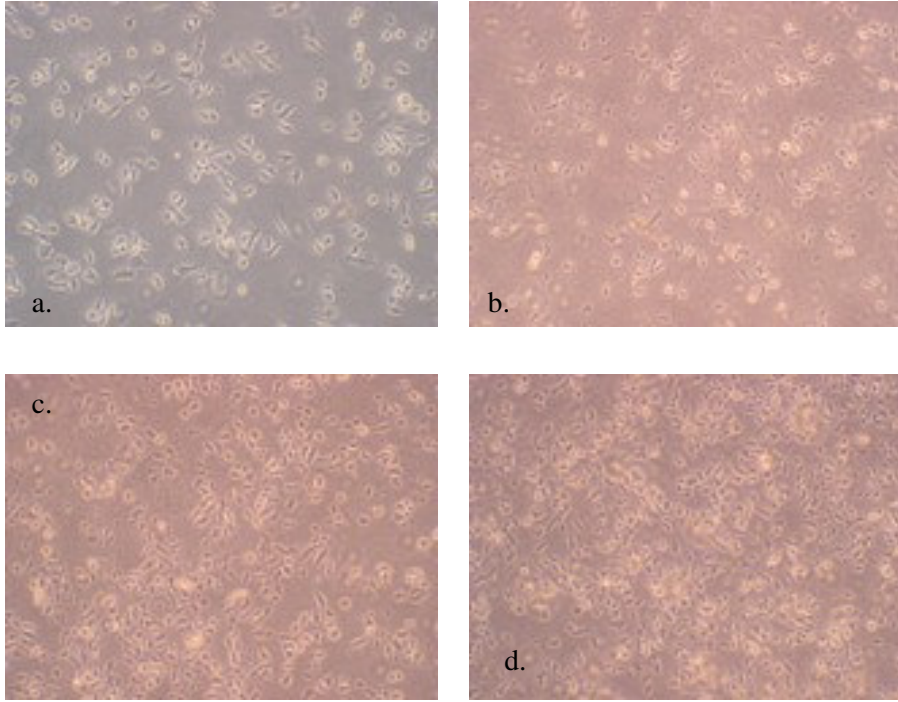
%0.5 ve %1.125 *Spirulina* ekstraktlı denemelerde %1.125 oranında ham ekstrakt ihtiva eden cilt kreminin hücre göçünü ve proliferasyonunu daha fazla oranda arttırdığı saptanmıştır.

Hücre kültüründe 14. günde hücreler yavaş yavaş dökülmeye başladıklarından dolayı bir diğer denemede 5 ve 10 gün sürelerle inkubasyona bırakılmıştır.

Yara İyileşmesi-III.Deneme-5.Gün

**Şekil 4.12.** 5.günde a.hücre kontrol, b.krem kontrol, c.%0.5 ham ekstrakt içeren d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kreminde açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri

### Yara İyileşmesi-III.Deneme-10.Gün

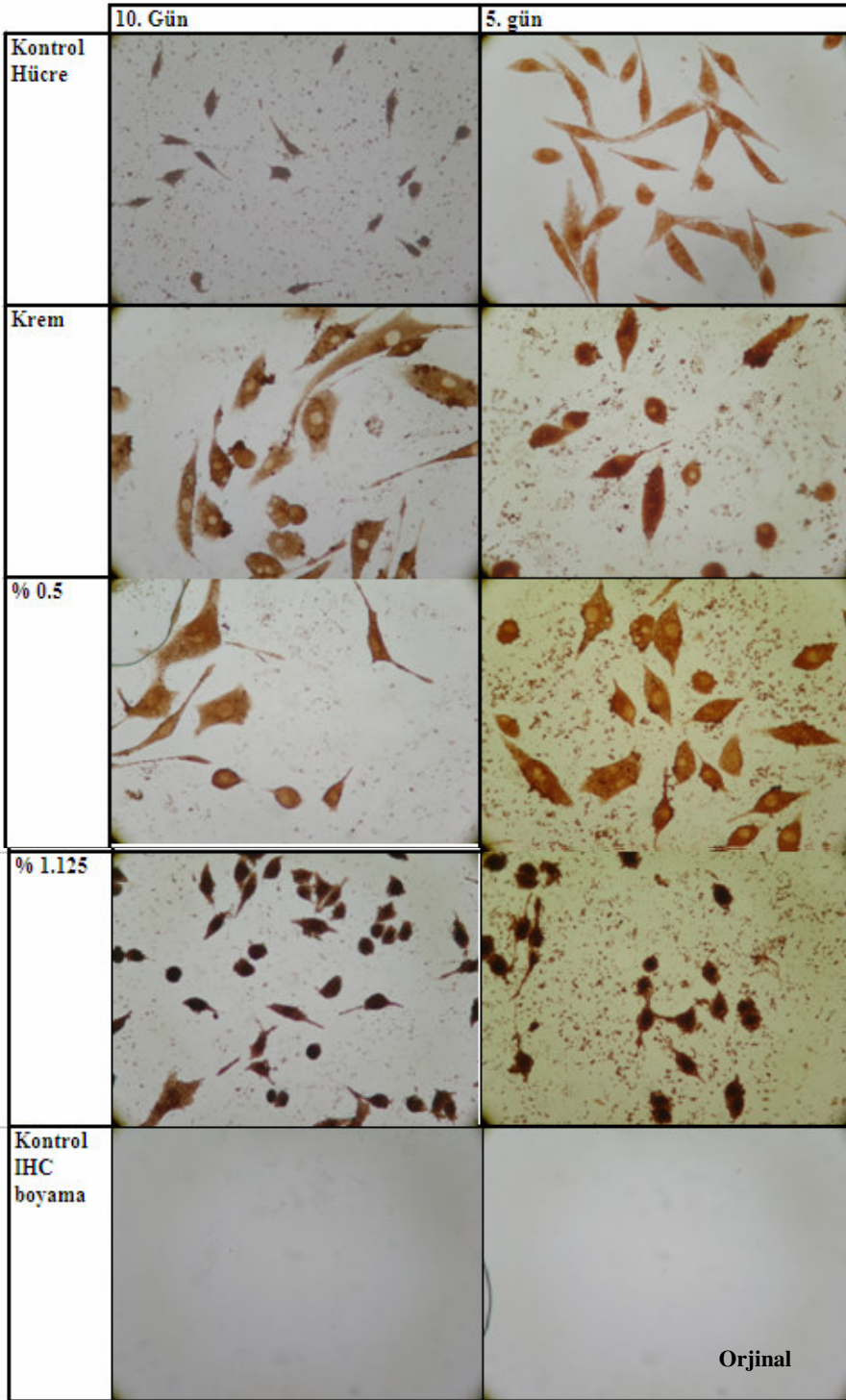


**Şekil 4.13.** Yara iyileşmesi testinin 10.gününde a.hücre kontrol, b.krem kontrol, c.%0.5 ham ekstrakt içeren d.%1.125 ham ekstrakt içeren cilt kreminde açılan yaraların iyileşme durumları ve hücre göçleri

Farklı süre inkubasyonlarla yapılan yara iyileşmesi testlerinde, en iyi sonuçların 5 ve 10.günlerde olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.12 ve 4.13'te görüldüğü gibi hücre göçü ve proliferasyonu %1.125'lik kremde en fazla oranda gözlenmiştir. Geliştirilen cilt kremlerinin hücre kontrole göre daha fazla oranda yara iyileşmesi sağladığı saptanmıştır. %1.125 oranında *Spirulina platensis* ham ekstrakt içeren cilt kremlerinin %0.5 *Spirulina* katkı krem ve krem kontrol grubuna göre proliferasyonu ve hücre göçünü daha yüksek oranda arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji A.B.D tarafından yapılan immunhistokimya analizi sonucunda kollajen oluşumunda da belirgin bir artış bulunmuştur.

## **Immunohistokimya Sonuçları**

Tüm grupta hücrelerin çoğu fibroblast karakterinde iken, yer yer yuvarlak hücrelerde rastlandı. Kollajen 1 immunoreaktivitesinin kontrol grubunda hücrelerde zayıf şiddette gözlemlendi. Krem uygulanan grupta ise kollajen 1 immunoreaktivitesinin zayıf şiddette olduğu, 0.5 oranında uygulama sonucunda immunoreaktivitenin daha arttığı izlendi. 1.25 oranında uygulama yapılan hücrelerde ise kollajen 1 immunoreaktivitesinin şiddetli pozitif olduğu saptandı. Immunohistokimya boyamasının kontrolü amacıyla yapılan örneklerde ise boyanmaya rastlanmadı (Şekil 4.14).

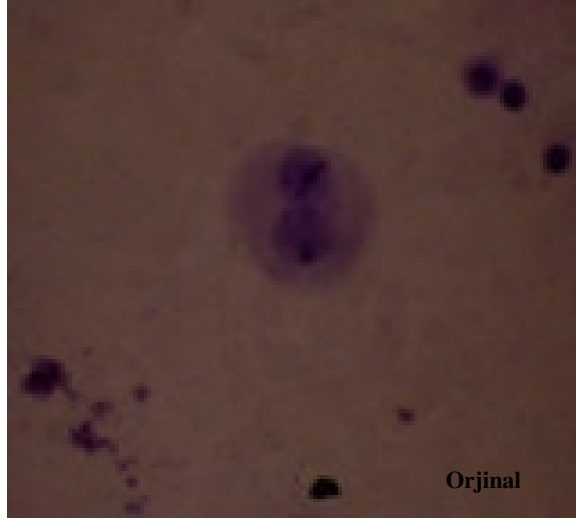


Şekil 4.14. Immunhistokimya sonuçları

#### 4.5. *In Vitro* Genotoksisite Testleri - Mikronukleus Test Sonuçları

Krem kontrol ve farklı oranlarda *Spirulina* ekstraktı içeren cilt kremlerinin mikronukleus analizleri yapılmıştır. Yara iyileşmesinde pozitif sonuçlar elde edilen %0.5 ve %1.125 *Spirulina* ham ekstrakt içeren cilt kremlerinin mikronukleus analizi ile genotoksik etkisi incelenmiştir. Denemeler kendi içinde 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3’de mikronukleus analizine ait sonuçlar görülmektedir. Şekil 4.15’te ise Giemsa boyama sonucu mikroskopik olarak gözlemlenen mikronukleuslar görülmektedir.

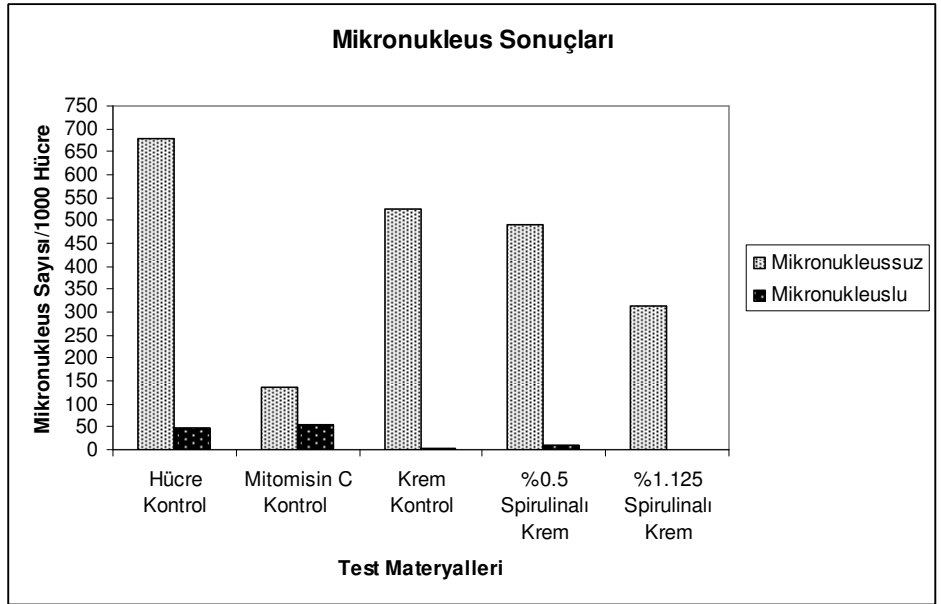


Şekil 4.15. Metafaz plağında görülen mikronukleus



Çizelge 4.3. Cilt kremi mikronukleus sonuçları

		Mitomisin C Kontrol	Hücre Kontrol	Krem Kontrol	%0.5 Spirulina Krem	%1.125 Spirulina Krem
Tek Nukleuslu	Mikronukleussuz	522 %52.2	249 %24.9	468 %46.8	490 %49	672 %67.2
	Tek Mikronukleuslu	169 %16.9	16 %1.6	4 %0.4	10 %1	13 %1.3
	Çift Mikronukleuslu	56 %5.6	3 %0.3	- %0	- %0	- %0
	3 ve üzeri Mikronukleuslu	62 %6.2	3 %0.3	- %0	- %0	- %0
Çift Nukleuslu	Mikronukleussuz	135 %13.5	680 %68	526 %52.6	490 %49	315 %31.5
	Tek Mikronukleuslu	34 %3.4	30 %3	2 %0.2	10 %1	- %0
	Çift Mikronukleuslu	11 %1.1	19 %1.9	- %0	- %0	- %0
	3 ve üzeri Mikronukleuslu	11 %1.1	- %0	- %0	- %0	- %0
Toplam		1000	1000	1000	1000	1000



**Şekil 4.16.** Mikronukleus sonuçlarının değerlendirilmesi

Mikronukleus analizi sırasında kör kontrol olarak hücre üretme ortamında üretilen hücreler, pozitif kontrol olarak mutajenik etkisi olduğu bilinen ve mikronukleus oluşumuna neden olan mitomisin C kimyasalı kullanılmıştır. Mikronukleus oluşumları, sitokalasin B ile sitokinezi durdurulmuş çift çekirdekli hücrelerde mikronukleus sayımı ile incelenmiştir.

Metafaz plakları sayılmış ve gözlenen 1, 2, 3 ve üzeri mikronukleuslu hücreler kaydedilmiştir. Mitomisin C kimyasalını içeren hücrelerde 1, 2 ve 3 mikronukleus içeren hücreler sırasıyla % 3.5, %1.1 ve %1.1 oranlarında bulunmuştur (Şekil 4.16). Krem kontrol ve %1.125 *Spirulina* ham ekstrakt içeren kremlerde mikronukleus oluşumları gözlenmezken %0.5 *Spirulina* ham ekstrakt içeren kremde %1 oranında mikronukleus oluşumu gözlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, farklı *Spirulina platensis* ham ekstrakt içeren cilt kremlerinin *in vitro* sitotoksik, genotoksik ve yara iyileşmesi üzerine etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaca yönelik öncelikli olarak *Spirulina platensis*'in kontrollü laboratuvar koşullarında üretimi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen kremin formülasyonuna ilave edilecek olan ham ekstrakt ve biyokütlenin protein analizi, fikosiyanın tayini ile özellikleri standardize edilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışma sonucunda, %1.125 *Spirulina platensis* ham ekstrakt içeren cilt kreminin yara iyileşmesini olumlu yönde geliştirdiği, hücre göçü ve proliferasyonunu arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca yapılan *in vitro* genotoksisite testleri ile de genetik materyalde herhangi bir kalıcı hasar oluşturmadığı belirlenmiştir.

MTT test yönteminin sitotoksisitenin belirlenmesinde, kullanışlı ve hızlı bir metot olduğu belirtilmektedir. MTT ile oluşan formazan yoğunluğunun, direkt olarak yaşayan, canlı hücre sayısı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sipahi vd., 2005). Ancak hücre yoğunluğundan etkilendiği düşünülmektedir. Bu nedenle alternatif, paralel metotlarla tekrarlanabilir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda 3 boyutlu episkin gibi deri modelleri de kullanılabilir. Ayrıca bir sonraki aşamada *in vitro* test sonuçları kullanılarak *in vivo* denemeler yapılabilir ve böylelikle *in vitro* ile *in vivo* testler arasında bir korelasyon sağlanabilir. Böylece hayvan denemelerinin önüne geçilebilir. Yapılan birçok çalışmada bu şekilde korelasyon yapılmaktadır. Genotoksik etkiyi gözlemek amacıyla yapılan mikronükleus analizine ek olarak karyotip analizi yapılarak karyogramı çıkartılabilir.

Bu bitirme tezi çalışması, bir SANTEZ projesi olarak özel sektör işbirliği ile yapılmış ve hayata geçirilmiştir. Bu şekilde yerli bir ürün

geliştirilmiş ve hücre düzeyinde cilt üzerindeki etkileri incelenmiştir. Böylece bilimsel güvenilirliği olan yeni bir ürünün ortaya çıkması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın, kozmetik sektöründe özellikle mikroalg gibi doğal kaynaklardan yeni ürün ve formülasyonların geliştirilmesi açısından öncü olması ve yeni Ar-Ge projelerinin önünü açması beklenmektedir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahsan, M., Habib, B., Parvin, M.,** 2008, A Review On Culture, Production and Use of Spirulina as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish, FAO.
- Anonymous, ISO 10993-1,** 1999, Biological Evaluation of Medical Devices, Evaluation and Testing.
- Anonymous, ISO 10993-3,** 1999, Biological Evaluation of Medical Devices, Tests for Genotoxicity, Carcinogenicity and Reproductive Toxicity.
- Anonymous, ISO 10993-12,** 1999, Biological Evaluation of Medical Devices, Sample Preparation and Reference Materials.
- Anonymous,** 2003, Recommended Mutagenicity / Genotoxicity Tests For The Safety Testing Of Cosmetic Ingredients To Be Included In The Annexes To Council Directive 76/768/Eec, SCCNFP's Notes Of Guidance.
- Anonymous,** 1998, Note For Guidance On Genotoxicity: A Standard Battery For Genotoxicity Testing Of Pharmaceuticals, CPMP/ICH/174/95.
- Anonymous, OECD TG 483,** 1997, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test.
- Anonymous, OECD Guideline For The Testing Of Chemicals Draft Proposal For A New Guideline 487,** 2004, *In Vitro* Micronucleus Test.
- Arıkan, F., Becerik, S., Sönmez, Ş. ve Gürhan, İ.,** 2007, Effect of Platelet-Rich Plasma on Gingival and Peridontal Ligament Fibroblast: New In Vitro Growth Assay, Brazillian Journal of Oral Sciences, 6(23), 1432-1437.
- Becker, E.W.,** 1982, Biotechnology and Exploitation of Algae-The Indian Approach, Germany, 55p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Becker, E.W.**, 1995, *Microalgae: Biotechnology and microbiology*, Cambridge University pres, 293p.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., Canestrari, F.**, 2004, Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*, *Life Sciences* 75:2353–2362.
- Bhat, B., V., Madyastha, K., M.**, 2000, C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger *in Vivo* and *in Vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 20–25
- Boussiba S., Richmond, A.**, 1979, Isolation and purification of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 120:155-159.
- Chopra, K. and Bishnoi, M.**, 2008, Chapter 5, Antioxidant Profile of *Spirulina*: A Blue-Green Microalga; *Spirulina* in Human Nutrition and Health, **Gershwin, M., E., Belay, A. (Editors)**, CRC Press, 101-114p.
- Chronakis, I.S., Galatanu, A.N., Nylander T. and Lindman, B.**, 2000, The Behaviour of Protein Preparations from Blue-Green Algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air: Water Interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 173: 181-192p.
- Ciferri, O.**, 1983, *Spirulina*, the Edible Microorganism, *Microbiological Reviews*, p. 551-578.
- Cohen, Z.**, 1999, *Chemicals from Microalgae*, Taylor&Francis, 313-315 p., 334-335p.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Colla, L., M., Furlong, E., B., Costa, J., A., V.,** 2007, Antioxidant Properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* Cultivated Under Different Temperatures and nitrogen Regimes, Brazilliiian Archives of Biology and Technology, 1:161-167.
- Day, J., G., Benson, E, E., Fleck, R., A.,** 1999, *In Vitro* Culture and Conservation of Microalgae: Application for Aquaculture, Biotechnology and Environmental Research, In Vitro Cell. Dev. Biol.
- Desai, K., Sivakami, S.,** 2007, Purification and biochemical characterization of a superoxide dismutase from the soluble fraction of the cyanobacterium, *Spirulina platensis*, World J Microbiol Biotechnol, 23:1661–1666.
- Draelos, Z., D.,** 2007, Chapter 8:Cosmeceuticals, Facial Rejuvenation, 167-183.
- El-Baky, H., H., A., Baz, F., K., E., El-Baroty, G., S.,** 2009, Phenolics from *Spirulina maxima*: Over-Production and *In Vitro* Protective Effect of Its Phenolics on CCl<sub>4</sub> Induced Hepatotoxicity, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(1), pp. 024-030.
- Fotakis, G., Timbrell, J., A.,** 2006, *In Vitro* Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride, Toxicology Letters, 160:171-177.
- Fox, D., R.,** 1996, Spirulina Production and Potential, Edisud Press, 16p.
- Freshney, R., I.,** 1994, Culture of Animal Cells A Manual of Basic Techique, Wiley-Liss, Inc.
- Freshney, I.,** 2001, Chapter 2, Application of Cell Cultures to Toxicology, Cell Biology and Toxicology.; 17: 213–230.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

**Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y.,** 2006, Algal Antioksidanlar, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi.

**Gudin, C.,** 2009, Antioxidants from Microalgae, Thallia Pharmaceuticals S. A., France.

(<http://www.cbb-developpement.com/Cosming/resumes.htm>)

**Güneş, S., Tamburacı, S., Conk Dalay, M., Konyaloğlu, S.,** 2008, International Enzyme Engineering Symposium- “Superoxide Determination in Some microalgae” poster presentation, İzmir.

**Janknegt J. P., Rijstenbil, J., W., Poll, W.,H., V., Gechev, T., S., Buma, A., G., J.,** 2007, A Comparison of Quantitative and Qualitative Superoxide Dismutase Assays for Application to Low Temperature Microalgae, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 87:218–226.

**Kaba, N., Çağlak, E.,** 2006, Deniz Alglerinin İnsan Beslenmesinde Kullanılması, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Volume 23:243-246.

**Kılıç, C., Göksan, T., Ak, İ., Gökpınar, Ş.,** 2006, İki Farklı *Spirulina platensis* Suşunun Büyüme Özelliklerinin Karşılaştırılması, E.Ü., Su Ürünleri Dergisi.

**Liang C.-C., Park A. Y., Guan J.-L.,** 2007, *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro, Nature Publishing Group.

**Lods, L. M., Dres, C., Johnson C., Scholz, D., B., Brooks, G., J.,** 2000, The Future of Enzymes in Cosmetics, International Journal of Cosmetic Science, 22:85-94.

**Madigan M.T., Martingo, J.M. and Parker, J.,** 2000, Brock biology of Microorganisms, Printed in the United States of America , Ninth Ed.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Masters, R., W., J.**, 2000, Animal Cell Culture Practical Approach, Third Ed., Oxford University Press, 192 p.
- Mather, P., J., Barners, D.**, 1998, Animal Cell Culture Methods, Academic Press, 261-262p.
- Minkova, K.M., Tchernov, A.A., Tchorbadjieva, M.I., Fournadjieva, S.T. , Antova, R.E., Busheva, M.Ch.**, 2002, Purification of C-phycoyanin from *Spirulina (Arthrospira) fusiformis*, Journal of Biotechnology.
- Miranda, M., S., Cintra, R., G., Barros, S., B., M., Mancini-Filho, J.**, 1998, Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31: 1075-1079.
- Nursal Z.,T., Baykal A., Hamamoğlu E.**, 1999, Wound Healing in the elderly:is there a difference?, Turkish Journal of Geriatrics, Geriatri2(1): 29-32.
- Oliveira, M.A.C.L. De, Monteiro, M.P.C., Robbs, P.G., Leite, S.G.F.**, 1999, Growth and Chemical Composition of *Spirulina maxima* and *Spirulina platensis* Biomass at Different Temperatures, Aquaculture International 7: 261–275.
- Pelizer L.H., Danesi E.D.G., Rangel C.O., Sassano C.E.N., Carvalho J.C.M., Sato S., Moraes I.O.**, 2003, Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation, *Journal of Food Engineering*, 56, 371-375p.
- Pulz, O., Gross, W.**, 2004, Valuable Products from Biotechnology of Microalgae, Applied Microbiology and Biotechnology, 65:635-648.
- Rafiqul, I., M., Jalal, K.C.A., Alam, M.Z.**, 2005, Environmental Factors for Optimisation of *Spirulina* Biomass in Laboratory Culture, Biotechnology, 19-22.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Richmond, A.**, 2004, Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Blackwell Science.
- Rodriguez L. X., Wu, G., Guan, J. L.**, 2008, Wound Healing Assay, Cell Migration Developmental Methods and Protocols.
- Romay, C., González, R., Ledón, N., Ramirez, D., Rimbau, V.**, 2003, C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects, Current Protein and Peptide Science, 4, 207-16.
- Sanchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo C., Rodriguez I.**, 2003, *Spirulina (Arthrospira): An edible microorganism. A Review.*
- Schmid, D., Besler, E., Meister, S.**, 2009, Slimming and Tissue Strengthening: Soy Isoflavone for a Perfect Body, Mibelle Biochemistry.
- Sekar, S., Chandramohan, M.**, 2007, Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization, Journal of Applied Phycol.
- Singh, S., Kate, N., B., Banerjee, U., C.**, 2005, Bioactive Compounds from Cyanobacteria and Microalgae: An Overview, Critical Reviews in Biotechnology, 25:73–95.
- Spolaore, P., Cassan-Joannis, C., Duran, E., Isambert, A.**, 2006, Commercial Application of Microalgae, Journal of Bioscience and Bioengineering, 101:87-96.
- Şenol, M.**, 1995, Yara İyileşmesi, T *Klin J Dermatol* 5.
- Tietze, H., W.**, 2004, Micro Food Macro Blessing, Fourth Ed., Australia.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

**Tornabene, T. G., Bourne, T. F., Raziuddin, S. , Ben-Amotz, A.,** 1985, Lipit and lipopolysaccharide constituents of cyanobacterium *Spirulina platensis* (Cyanophyceae, Nostocales), Marine Ecology - Progress Series, 22: 121-125.

**Tremel A., Cai A., Tirtaatmadja N., Hughes B.D., Stevens G.W., Landman K.A., O'Connor A.J.,** 2008, Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing, Chemical Engineering Science, 247-253.

<http://www.biophysics.com/applications/woundhealing.html>

<http://we.vub.ac.be/~cege/volders/ENG/tests/MN.htm>

[http://www.massey.ac.nz/~imbs/genetic\\_damage\\_humans.htm](http://www.massey.ac.nz/~imbs/genetic_damage_humans.htm)

## ÖZGEÇMİŞ

Suna Seda GÜNEŞ, 11.01.1984 yılında İzmir’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Selçuk Yaşar Alaybey İlköğretim Okulu’nda, lise eğitimini ise İzmir Şemikler Lisesi (YDA)’nde tamamladı. 2001 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü’nü kazandı. 2006 yılında “Mikroalglerden Biyodizel Üretimi” konulu lisans tezini vererek mezun oldu. 2006 yılında yüksek lisans çalışmalarına Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda başlamıştır.