

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

RESVERATROL, KOENZİM Q10 VE VİTAMİN E İÇEREN LİPOZOM HAZIRLANMASI VE YAŞLANMA KARŞITI ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO TEST EDİLMESİ

AYLİN ÜLKÜCÜ

DANIŞMAN
PROF. DR. FATMA GÜLGÜN YENER

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Bu tez çalışmasını değerli annem Ecz. Feryal Ülkücü ve değerli babam Dr. Osman Ulaş Ülkücü'ye ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam boyunca yardımlarını, ilgisini, anlayışını ve olumlu düşüncelerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın **Prof.Dr. F.Gülgün YENER**'e, tez komitemde yer alan ve çalışmalarım boyunca beni destekleyen Sayın **Prof.Dr. Ümit GÖNÜLLÜ**'ye ve değerli katkıları ile tez çalışmamda beni motive eden Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Gülengül DUMAN**'a, çalışmam boyunca beni destekleyen Ali Raif İlaç San. A.Ş. AR-GE Direktörü Sayın **Prof. Dr. Serdar ÜNLÜ**'ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN..... **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**
İTHAF.....İİ
TEŞEKKÜR.....İİİ
İÇİNDEKİLER ..... İV
TABLOLAR LİSTESİ.....X
ŞEKİLLER LİSTESİ .....Xİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....XVİİİ
ÖZET XX
ABSTRACT..... XXİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Deri 4
2.1.1. Epidermis 5
2.1.1.1. Keratonisitler.....8
2.1.1.2. Melanositler.....8
2.1.1.3. Langerhans Hücreleri 9
2.1.1.4. Merkel Hücreleri 9
2.1.1.5. Doğal Nemlendirici Faktör (NMF) 9
2.1.2. Dermis.....12
2.1.3. Hipodermis.....12
2.1.4. Yağ Bezleri 13
2.1.5. Ekrin Bezleri 14
2.2. Deriden Geçiş Yolları 15
2.2.1. Deriden Geçiş Mekanizmaları 16
2.2.2. Deriden Geçişi Arttırmaya Yönelik Yaklaşımlar.....17
2.3. Deri Yaşlanması.....18
2.3.1. Oksidatif Stres.....22
2.3.2. Deri Yaşlanmasını Önlemeye Yönelik Yaklaşımlar.....27
2.3.3. Fotokoruma ve Antioksidanlar.....27
2.3.3.1. Resveratrol 29

2.3.3.2. Vitamin E 32
2.3.3.3. Koenzim Q10 34
2.4. İlaç Taşıyıcı Sistemler.....36
2.4.1. Lipozomlar 37
2.4.1.1. Lipozomların Yapısı.....39
2.5. Deriden Geçişin Ölçümünde Kullanılan Yöntemler.....54
2.5.1. Franz Difüzyon Hücresi 55
2.6. Difüzyon 62
2.6.1. Fick'in Birinci Kanunu 63
2.6.2. Fick'in İkinci Kanunu 63
2.6.3. Difüzyonda Denge Durumu 64
2.7. İlaç Salım Kinetiği 65
2.7.1. Sıfırıncı Dereceden Kinetik 65
2.7.2. Birinci Dereceden Kinetik 65
2.7.3. Higuchi Kinetiği.....66
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....67
3.1. Gereçler.....67
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 67
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler.....68
3.1.2.1. Kullanılan Aletler.....68
3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler.....68
3.2. Yöntem.....69
3.2.1. Resveratrolün Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi 69
3.2.2. Resveratrolün HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....69
3.2.2.1. Doğrusallık.....70
3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım 71
3.2.2.3. Kesinlik 71
3.2.2.4. Özgünlük ve Seçicilik 71
3.2.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 72
3.2.3. Resveratrol Çözünürlük Testi 72
3.2.4. Koenzim Q10'un Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi.....72
3.2.5. Koenzim Q10'un HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 73
3.2.5.1. Doğrusallık.....73

3.2.5.2. Doğruluk ve Geri Kazanım 74
3.2.5.3. Kesinlik 74
3.2.5.4. Özgünlük ve Seçicilik 74
3.2.5.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 75
3.2.6. Koenzim Q10 Çözünürlük Testi 75
3.2.7. Vitamin E'nin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi.....75
3.2.8. Vitamin E'nin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....76
3.2.8.1. Doğrusallık.....76
3.2.8.2. Doğruluk ve Geri Kazanım 77
3.2.8.3. Kesinlik 77
3.2.8.4. Özgünlük ve Seçicilik 77
3.2.8.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 77
3.2.9. Vitamin E Çözünürlük Testi 78
3.2.10. Etken Maddelerin Hücre Kültürü Toksisite Testi 78
3.2.11. İn vitro Çalışmalarda Kullanılan Formülasyonlar.....80
3.2.12. İn vitro Çalışmalarda Kullanılan Formülasyonların Hazırlanması 80
3.2.13. Aktif madde içermeyen lipozomların hazırlanması 81
3.2.13.1. Resveratrol içeren Lipozom Hazırlanması.....82
3.2.13.2. Koenzim Q10 içeren Lipozom Hazırlanması.....82
3.2.13.3. Vitamin E içeren Lipozom Hazırlanması.....82
3.2.13.4. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren lipozom hazırlanması 82
3.2.13.5. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren Krem Hazırlanması 83
3.2.14. İn vitro Çalışmalarda Kullanılan Lipozomların Karakterizasyonu.....83
3.2.14.1. Lipozomların Partikül büyüklüğü, Partikül boyutu Dağılımı ve Zeta potensiyel Analizi.....84
3.2.14.2. Lipozomların Şekli.....84
3.2.14.3. Lipozomların pH Ölçümü 84
3.2.14.4. Lipozomların Kapsülleme Verimliliği Tayini.....84
3.2.15. Lipozomların Hücre Kültürü Toksisite Testi 85
3.2.16. Lipozom Formülasyonlarına Ait Stabilite Çalışmaları 85
3.2.17. Lipozom Formülasyonlarında Resveratrol Miktar Tayini 85
3.2.18. Lipozom Formülasyonlarında Koenzim Q10 Miktar Tayini.....85
3.2.19. Lipozom Formülasyonlarında Vitamin E Miktar Tayini 86

3.2.20. İn vitro Geçiş Çalışmaları 86
3.2.21. Antioksidan Etki Tayini 87
3.2.22. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi.....88
3.2.22.1. Aritmetik Ortalama ($\bar{x}$).....89
3.2.22.2. Standart Sapma (SD).....89
3.2.22.3. Bağıl Standart Sapma.....89
3.2.22.4. Güven Aralığı.....90
3.2.22.5. Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA).....90
4. BULGULAR.....91
4.1. Resveratrole Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular.....91
4.1.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular.....91
4.1.2. HPLC Yöntemiyle Resveratrol Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular……...92
4.1.2.1. Doğrusallık.....92
4.1.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım 93
4.1.2.3. Kesinlik 94
4.1.2.4. Özgünlük ve Seçicilik 95
4.1.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 96
4.1.3. Resveratrolün Çözünürlüğüne Ait Bulgular 96
4.2. Koenzim Q10'a Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular 97
4.2.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular.....97
4.2.2. HPLC Yöntemiyle Koenzim Q10 Miktar Tayini YöntemininValidasyonuna Ait Bulgular……...97
4.2.2.1. Doğrusallık.....98
4.2.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım 99
4.2.2.3. Kesinlik 100
4.2.2.4. Özgünlük ve Seçicilik 101
4.2.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 102
4.2.3. Koenzim Q10'un Çözünürlüğüne Ait Bulgular.....102
4.3. Vitamin E'ye Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular 103
4.3.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular.....103
4.3.2. HPLC Yöntemiyle Resveratrol Miktar Tayini YönteminiValidasyonuna Ait Bulgular……103

4.3.2.1. Doğrusallık 104
4.3.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım 105
4.3.2.3. Kesinlik 106
4.3.2.4. Özgünlük ve Seçicilik 107
4.3.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı 108
4.4. Aktif Bileşenlerin Sitotoksisite Testlerine Ait Bulgular 109
4.5. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular 110
4.5.1. Boş Lipozomlara Ait Bulgular 110
4.5.2. Aktif Bileşen İçeren Lipozomlara Ait Bulgular 111
4.5.3. Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulgular 111
4.5.3.1. Boş lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular 111
4.5.3.2. Resveratrol Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular 113
4.5.3.3. Koenzim Q10 Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular 115
4.5.3.4. Vitamin E Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular 117
4.5.3.5. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular 119
4.5.3.6. Aktif Madde İçermeyen Lipozomların Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular 121
4.5.3.7. Resveratrol Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular 122
4.5.3.8. Koenzim Q10 Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular 123
4.5.3.9. Vitamin E Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular 124
4.5.3.10. Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular 125
4.5.4. Lipozomların Şekilleri 126
4.5.5. Lipozomların pH Değerleri 127
4.5.6. Lipozomlarda Aktif Bileşen Miktar Tayini 128
4.5.6.1. Lipozomlarda Hapsedilen Resveratrol Miktar Tayini 128
4.5.6.2. Lipozomlarda Hapsedilen Koenzim Q10 Miktar Tayini 130
4.5.6.3. Lipozomlarda Hapsedilen Vitamin E Miktar Tayini 132
4.5.7. Lipozomlara Ait Sitotoksisite Analizi Bulguları 134

4.5.8. In vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular 135
4.5.8.1. Resveratrolün in vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular 136
4.5.8.2. Koenzim Q10'un in vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular.....145
4.5.8.3. Vitamin E'nin in vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular.....155
4.5.9. Antioksidan Aktivite Testine Ait Bulgular 165
5. TARTIŞMA 168
KAYNAKLAR 183

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Lipozom hazırlarken kullanılan fosfolipit örnekleri ve özellikleri 44
Tablo 3-1: Resveratrolün HPLC ile miktar tayini koşulları 69
Tablo 3-2: Koenzim Q10'un HPLC ile miktar tayini koşulları 73
Tablo 3-3: Vitamin E'nin HPLC ile miktar tayini koşulları 76
Tablo 3-4: Krem formülasyonu içeriği 83
Tablo 4-1: Resveratrolün geri kazanım ile hesaplanan miktarları (n=3) 93
Tablo 4 - 2: Resveratrolün deney içi kesinlik sonuçları 94
Tablo 4 - 3: Resveratrolün deneyler arası kesinlik sonuçları 95
Tablo 4-4: Koenzim Q10'un geri kazanım ile hesaplanan miktarları (n=3) 99
Tablo 4-5: Koenzim Q10'un deney içi kesinlik sonuçları 100
Tablo 4-6: Koenzim Q10'un deneyler arası kesinlik sonuçları 101
Tablo 4-7: Vitamin E'nin geri kazanım ile hesaplanan miktarları (n=3) 105
Tablo 4-8: Vitamin E'nin deney içi kesinlik sonuçları 106
Tablo 4-10: Boş lipozomların partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri 110
Tablo 4-11: Lipozom formülasyonları 111
Tablo 4-12: Boş lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları 112
Tablo 4-13: Boş lipozomlara ait PDI sonuçları 112
Tablo 4-14: Resveratrol lipozomlarına ait damlacık büyüklüğü sonuçları 113
Tablo 4-14: Resveratrol lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 114
Tablo 4-15: Resveratrol lipozomlarına ait partikül dağılımı sonuçları 115
Tablo 4-16: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 116
Tablo 4-17: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları 117
Tablo 4-18: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 118
Tablo 4-19: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları 118
Tablo 4-20: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 120
Tablo 4-21: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları 121
Tablo 4-22: Boş lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları 122
Tablo 4-23: Resveratrol lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 123
Tablo 4-24: Koenzim Q10 lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 124

Tablo 4-25: Vitamin E Lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 125
Tablo 4-26: Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 126
Tablo 4-27: Lipozomların pH değerleri (4 ºC) 128
Tablo 4-28: Lipozomların pH değerleri (25 ºC) 128
Tablo 4-29: Lipozomların pH değerleri (40 ºC) 128
Tablo 4-30: RSV-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları 129
Tablo 4-31: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları 130
Tablo 4-32: KoQ10-Lipozom'lardaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları 131
Tablo 4-33: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları 132
Tablo 4-34: VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları 133
Tablo 4-35: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları 134
Tablo 4-36: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 136
Tablo 4-37: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 137
Tablo 4-38: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 139
Tablo 4-39: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 140
Tablo 4-40: Krem formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 142
Tablo 4-41: Krem formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 143
Tablo 4-42: Resveratrolün selüloz asetat membrandan in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi 145
Tablo 4-43: Resveratrolün domuz derisinden in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi 145
Tablo 4-44: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 146

Tablo 4-45: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 147
Tablo 4-46: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 149
Tablo 4-47: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 150
Tablo 4-48: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 152
Tablo 4-49: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 153
Tablo 4-50: Koenzim Q10'un selüloz asetat membrandan in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi 155
Tablo 4-51: Koenzim Q10'un domuz derisinden in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi 155
Tablo 4-52: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 156
Tablo 4-53: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 157
Tablo 4-54: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 159
Tablo 4-55: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 160
Tablo 4-56: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 162
Tablo 4-57: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²) 163
Tablo 4-58: Vitamin E'nin selüloz asetat membrandan in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi 165
Tablo 4-59: Vitamin E'nin domuz derisinden in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi 165
Tablo 4-60: Salım çalışmalarından elde edilen örneklerin antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar (n=3) 166

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Derinin yapısı 5
Şekil 2-2: Deriden geçiş yolları 15
Şekil 2-4: UV ışımasına maruz kalan deride meydana gelen reaksiyonlar 26
Şekil 2-5: Trans-resveratrol ve cis-resveratrolün kimyasal yapıları 30
Şekil 2-6: (a) tokoferollerin ve (b) tokotrienollerin temel yapısı 32
Şekil 2-7: Koenzim Q10 kimyasal yapısı 35
Şekil 2-8: İlaç taşıyıcı sistemler 37
Şekil 2-9: Lipozomların üç boyutlu yapısı 39
Şekil 2-10: Fosfolipit yapısı 40
Şekil 2-11: Gliserofosfolipidler 41
Şekil 2-12: Sfingolipidler 41
Şekil 2-13: Hücre zarının yapısı 42
Şekil 2-14. Vezikül Çeşitleri ve Çapları 46
Şekil 2-15: Lipozom hazırlama yöntemleri 47
Şekil 2-16: Franz Difüzyon hücresi 57
Şekil 2-17: Franz difüzyon hücresinde ilacın zardan alıcı odaya geçişi 58
Şekil 2-18: (A) Domuz ve (B) insan derisinin karşılaştırmalı histolojik görüntüsü (*Hematoksilen-Eozin boyama)* 61
Şekil 3-1: MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi 79
Şekil 3-2: DPPH ile antioksidan molekül arasındaki reaksiyon 88
Şekil 4-1: Transresveratrole ait 200-300 nm arası dalga boyu taraması 91
Şekil 4-2: Transresveratrole ait HPLC kromatogramı 92
Şekil 4-3: Resveratrolün HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=3) 93
Şekil 4-4: Resveratrolün pik verdiği dalga boyunda a) mobil faz, b) boş lipozom, c) koenzim Q10 ve d) vitamin E'ye ait kromatogramlar 96
Şekil 4-5: Koenzim Q10'a ait 200-300 nm arası dalga boyu taraması 97
Şekil 4-6: Koenzim Q10 piki 98
Şekil 4-7: Koenzim Q10'un HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=3) 99
Şekil 4-8: Koenzim Q10'un pik verdiği dalga boyunda a) mobil faz, b) boş lipozom, c) resveratrol ve d) vitamin E'ye ait kromatogramlar 102
Şekil 4-9: Vitamin E 'ye ait 240-340 nm arası dalga boyu taraması 103

Şekil 4-10: Vitamin E piki 104
Şekil 4-11: Vitamin E'nin HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=3) .. 105
Şekil 4-12: a) Koenzim Q10 b) Resveratrol c) Boş lipozom d) mobil faz kromatogramları 108
Şekil 4-13: Farklı konsantrasyonlarda aktif bileşen çözeltilerinin L929 fare fibroblast hücre hattındakitoksisitesi (n=3) 109
Şekil 4-14: Boş lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları 112
Şekil 4-15: Boş lipozomlara ait PDI sonuçları 113
Şekil 4-16: Resveratrol lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 114
Şekil 4-17: Resveratrol lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları 115
Şekil 4-18: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 116
Şekil 4-19: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları ... 117
Şekil 4-20: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 118
Şekil 4-21: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları 119
Şekil 4-22: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları 120
Şekil 4-23: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları 121
Şekil 4-24: Boş lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları 122
Şekil 4-25: Resveratrol lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 123
Şekil 4-26: Koenzim Q10 lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 124
Şekil 4-27: Vitamin E lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 125
Şekil 4-28: Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları 126
Şekil 4-29: Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarının elektron mikroskobu görüntüsü 127
Şekil 4-30: RSV-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları 129
Şekil 4-31: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları 130
Şekil 4-32: KoQ10-Lipozom'lardaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları 131
Şekil 4-33:RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları 132
Şekil 4-34: VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları 133

Şekil 4-35: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları 134
Şekil 4-36: Lipozom formülasyonlarının L929 fare fibroblast hücre hattındaki toksisitesi (n=3)..... 135
Şekil 4-37: MTT testi plakası örneği 135
Şekil 4-38: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 137
Şekil 4-39: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3) 137
Şekil 4-40: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 138
Şekil 4-41: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3) 138
Şekil 4-42: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili..... 139
Şekil 4-43: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3) 140
Şekil 4-44: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 141
Şekil 4-45: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3) 141
Şekil 4-46: Krem formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 142
Şekil 4-47: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3) 143
Şekil 4-48: Krem formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 144
Şekil 4-49: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3) 144
Şekil 4-50: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 146
Şekil 4-51: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Higuchi kinetğine göre in vitro salım profili (n=3) 147

Şekil 4-52: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 148
Şekil 4-53: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 148
Şekil 4-54: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 149
Şekil 4-55: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 150
Şekil 4-56: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 151
Şekil 4-57: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 151
Şekil 4-58: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 152
Şekil 4-59: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 153
Şekil 4-60: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 154
Şekil 4-61: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 154
Şekil 4-62: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 156
Şekil 4-63: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 157
Şekil 4-64: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 158
Şekil 4-65: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 158
Şekil 4-66: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 159
Şekil 4-67: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)..... 160

Şekil 4-68: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 161
Şekil 4-69: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 161
Şekil 4-70: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 162
Şekil 4-71: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 163
Şekil 4-72: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 164
Şekil 4-73: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3) 164
Şekil 4-74: Salım çalışmalarından elde edilen örneklerin antioksidan aktiviteleri..... 166

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

a/a: Ağırlık / Ağırlık

ANOVA: Analysis of Variance (Varyans Analizi)

C: Konsantrasyon cm. santimetre

cm^2: Santimetrekare

CMC: Kritik misel konsantrasyonu

CoQ10: Koenzim Q10

Da: Dalton

dak. Dakika

DLS: Dinamik ışık saçılımı

E: Emülsiyon

g:. Gram

GI: Gastrointestinal

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

h/h: Hacim / Hacim

JSS: Kararlı durum akışı

Kp: Permeabilite katsayısı

L: Litre

mg: Miligram

mL: mililitre

MWCO: Moleküler ağırlık ayırma sınırı

nm: Nanometre

Ort: Ortalama

PCS: Foton korelasyon spektroskopisi

PDI: Polidispersite Indeksi

RSV: Resveratrol

ROS: Reaktif Oksijen Ürünleri

R^2 : Determinasyon Katsayısı

rpm: Dakikadaki Dönüş Sayısı

RSD : Bağıl Standart Sapma

SC: Stratum Corneum

SD: Standart Sapma

TEWL: Transepidermal Su Kaybı

TEM: Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu

UCA: Ürokanik asit

UV: Ultraviyole

VitE: Vitamin E

VK: Varyasyon Katsayısı

µg.: Mikrogram

ÖZET

Ülkücü, A. (2023). Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren lipozom hazırlanması ve yaşlanma karşıtı etkinliğinin in vitro test edilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler : Antioksidan vitaminler, Domuz derisi, Deri yaşlanması, Resveratrol, Lipozom, Koenzim Q10, Vitamin E

Ultraviyole ışınları, deride serbest radikal üretimini arttırıp vücudun doğal antioksidan savunma mekanizmasını zayıflatarak cilt yaşlanmasına neden olur. Antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri nötralize edip dokulardaki oksidatif stresi önleyerek cildi fotoyaşlanmaya karşı koruyan maddelerdir. Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E, serbest radikalleri temizleyen güçlü antioksidanlardır. Ancak bu maddelerin düşük çözünürlüğe ve düşük oral biyoyararlanıma sahip olmaları, sistemik biyoyararlanımlarını düşürmekte ve kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu çalışmada, resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E içeren topikal bir lipozomal formülasyon hazırlanarak bu sınırlamaların önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E içeren lipozom (RSV-CoQ10-VitE-Lipo), resveratrol içeren lipozom (RSV-Lipo), koenzim Q10 içeren lipozom (CoQ10-Lipo), vitamin E içeren lipozom (VitE-Lipo) ve bu üç aktif maddeyi içeren konvansiyonel krem (RSV-CoQ10-VitE-Krem) hazırlanmıştır. Lipozomların yapısı, parçacık boyutu (PS), zeta potansiyeli (ZP), polidispersite indeksi (PDI) ve kapsülleme etkinliği (EE), farklı depolama koşullarında (4ºC, 25ºC ± % 65 bağıl nem ve 40ºC ± % 75 bağıl nem) hazırlandıktan (0. gün) sonra ve 7, 30, 60, 90, 180 gün sonra belirlenmiştir. Sitotoksisite, L929 fibroblast hücrelerinde MTT test ile değerlendirilmiştir. Franz hücrelerinde selüloz asetat membran ve domuz derisi ile in vitro permeasyon çalışmaları yapılmıştır. İn vitro numunelerin antioksidan aktiviteleri DPPH testi ile ölçülmüştür. RSV-CoQ10-VitE-Lipo için parçacık büyüklüğü 95.4 ± 0.02 nm, PDI 0,292 ± 0,01, ZP -49,7 ±0,2 mV olarak ölçülürken, kapsüllenen RSV miktarı %94,97 ±0,85, CoQ10 %95,88 ±0,75, VitE %95,63 ±0,55 olarak saptanmıştır. RSV-CoQ10-VitE-Lipo için hücre canlılığı %80'in üzerinde bulunmuştur. PS, PDI, ZP ve EE sonuçları lipozomların stabil olduğunu göstermiştir. In vitro salım çalışmalarında en yüksek miktarda aktif madde geçişinin RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonundan olduğu görülmüştür. Hazırlanan formülasyonların antioksidan aktiviteleri incelendiğinde, en yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonu geçiş örneklerinde görülmüştür. RSV-CoQ10-VitE-Lipo örneklerinin antioksidan aktivitesi konvansiyon kreme göre yaklaşık 4 kat daha fazla, diğer lipozomal formülasyonların (RSV-Lipo, CoQ10-Lipo, VitE-Lipo) DPPH aktivitelerine göre ise %50 daha fazladır.

Bu verilere dayanarak, antioksidan maddelerin lipozomlara kapsüllenmesinin stabilitelerini arttırabileceği, derinin bariyer tabakasını aşmada daha etkili olacağı ve böylece daha yüksek antioksidan aktivite ile cilt yaşlanmasına karşı etki sağlanacağı öngörülmüştür.

ABSTRACT

Ulkucu, A. (2023). Development and *In Vitro* Evaluation of An Anti-Aging Liposomal Formulation Containing Resveratrol, Coenzyme Q10 and Vitamin E. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology. Doctoral Thesis. İstanbul.

Key Words: Antioxidant vitamins, Pig skin, Skin aging, Resveratrol, Liposome, Coenzyme Q10, Vitamin E

Ultraviolet rays increase the production of free radicals in skin and weaken the body's natural antioxidant defense mechanism, causing skin aging. Antioxidants are substances that protect the skin against photoaging by neutralizing the free radicals and preventing oxidative stress in the tissues. Resveratrol, coenzyme Q10 and vitamin E are powerful antioxidants that scavenge free radicals. However, the low solubility and low oral bioavailability of these active substances reduce their systemic bioavailability and limit their use. In this study, it was aimed to overcome these limitations by preparing a topical liposomal formulation containing resveratrol, coenzyme Q10 and vitamin E.

A liposomal formulation containing resveratrol, coenzyme Q10 and vitamin E (RSV-CoQ10-VitE-Lipo), liposomes containing resveratrol (RSV-Lipo), liposomes containing coenzyme Q10 (CoQ10-Lipo), liposomes containing vitamin E (VitE-Lipo) and a conventional cream formulation containing resveratrol, coenzyme Q10 and vitamin E (RSV-CoQ10-VitE-Cream) were prepared. The structure, particle size (PS), zeta potential (ZP), polydispersity index (PDI) and encapsulation efficiency (EE) of liposomes were determined 0, 7, 30, 60, 90, 180 days after preparation under different storage conditions (4ºC, 25ºC ± 65% relative humidity and 40ºC ± 75% relative humidity). Cytotoxicity was evaluated by MTT assay in L929 fibroblast cells. In vitro permeation studies were performed on Franz cells with cellulose acetate membrane and pig skin. Antioxidant activities of in vitro samples were measured by DPPH test. For RSV-CoQ10-VitE-Lipo, the particle size was measured as 95.4 ± 0.02 nm, PDI was 0.292 ± 0.01, ZP was -49.7 ±0.2 mV. In RSV-CoQ10-VitE-Lipo, the amount of encapsulated RSV was 94,97% ±0,85, encapsulated CoQ10 was 95,88% ±0,75 and encapsulated VitE was 95,63% ±0,55. Cell viability for RSV-CoQ10-VitE-Lipo was found to be over 80%. PS, PDI, ZP and EE results showed that the liposomes were stable. In vitro release studies showed that the highest amount of active substance was permeated from RSV-CoQ10-VitE-Lipo formulation. When the antioxidant activities of the formulations were examined, the highest DPPH radical scavenging activity was observed in RSV-CoQ10-VitE-Lipo formulation transition samples. The antioxidant activity of RSV-CoQ10-VitE-Lipo samples is approximately 4 times higher than that of conventional cream and 50% higher than the DPPH activities of other liposomal formulations (RSV-Lipo, CoQ10-Lipo, VitE-Lipo).

In this study, it was assumed that encapsulating antioxidant substances into liposomes could increase their stability and skin permeation and prevent skin aging by providing higher antioxidant activity against ROS.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Cilt yaşlanması, zamana bağlı olarak gelişen, iç ve dış etmenlerin neden olduğu biyolojik bir olaydır. Ciltte hem kronolojik yaşlanma hem de fotoyaşlanma görülür. Kronolojik yaşlanma doğal, genetik ve hormonlarla ilgilidir (1). Fotoyaşlanmaya ise ultraviyole ışınları neden olur. Ultraviyole ışınları, deride serbest radikal üretimini arttırıp vücudun doğal antioksidan savunma mekanizmasını zayıflatır. Oksidatif stres epidermiste DNA hasarına ve dermal matrikste düzensizliğe neden olur (2). Antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri nötralize edip dokulardaki oksidatif stresi önleyerek cildi fotoyaşlanmaya karşı korur (3). Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E, serbest radikalleri temizleyen güçlü antioksidan maddelerdir (3,4,5). Ancak bu maddelerin düşük çözünürlüğe ve düşük oral biyoyararlanıma sahip olmaları, kullanımlarını sınırlamaktadır (3,6,7). Tez çalışmasında resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E'nin topikal bir lipozom formülasyonu hazırlanarak bu sınırlamaların önüne geçilmesi amaçlanmıştır.

Lipozomlar, bir veya daha fazla fosfolipit çift tabakadan oluşan veziküler taşıyıcı sistemlerdir (8). Membranlarının stratum korneumun ara madde lipidlerine çok benzemesi ve küçük moleküler yapıları nedeniyle deriye kolayca geçerler. Hem lipofilik hem hidrofilik etken maddeleri enkapsüle edebilirler. Çabuk bozunan, düşük oral biyoyararlanıma sahip etken maddelerin lipozomlarının hazırlanması ile stabilitelerinin arttırılması, daha derin katmanlara kısa sürede ve eşit dağılımlı olarak taşınabilmeleri sağlanabilmektedir (9).

Yapılan çalışmalarda, antioksidan maddelerin aktivelerinin birlikte kullanıldıklarında belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (3,10). Bunun yanında, şu ana dek resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E'nin birlikte kullanıldığı bir lipozom formülasyonu geliştirilmemiştir. Tez çalışmasında, resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E antioksidanlarının birlikte topikal olarak kullanılması ile etken maddelerin biyoyararlanım sınırlamalarının üstesinden gelinmesi, antioksidan aktivitenin arttırılması ve etken maddelerin deriye etkili derişimde ulaşmalarının sağlanması amaçlanmıştır.

Bu tezde, resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E içeren lipozom formülasyonu geliştirilmiş ve yaşlanma karşıtı etkinliği in vitro olarak incelenmiştir.

Çalışmada, beş farklı formülasyon incelenmiştir:

- Resveratrol içeren lipozom (RSV-Lipo)
- Koenzim Q10 içeren lipozom (CoQ10-Lipo)
- Vitamin E içeren lipozom (VitE-Lipo)
- Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E içeren lipozom

(RSV- CoQ10- VitE-Lipo)

- Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E içeren konvansiyonel krem

(RSV- CoQ10- VitE-Krem)

Lipozomlar hazırlandıktan sonra, stabilite, kapsülleme verimliliği ve salım özellikleri incelenmiştir. Franz difüzyon hücre sistemleri kullanılarak sentetik zar (selüloz asetat) ve domuz derisi ile salım çalışmaları yapılmış ve alıcı odaya salınan etken madde miktarları valide edilmiş kromatografik yöntemler kullanılarak zamana karşı izlenmiştir. Franz difüzyon hücresi, insan derisine uygulanan topikal preparatlardan deriye nüfuz eden ve sistemik dolaşıma geçen bileşen miktarını ölçen veya tahmin eden difüzyon testleri için kurulmuş bir sistemdir (11). Elde edilen sonuçların in vivo korelasyonlarının yüksek olması in vivo deneylere olan ihtiyacı azalttığı için Franz difüzyon sistemleri çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (12). Bu açıdan Franz difüzyon testleri daha az değişken içerdiği, etik ve tekrarlanabilir bir değerlendirme tekniği olduğu için tercih edilmiştir. Domuz derisi, insan derisine pek çok benzerliği (yağ birikintileri, foliküller, yoğunluk) olduğu için tercih edilmiştir (13,14). Geçiş çalışmalarına başlamadan önce formülasyonlarda kullanılacak etkin maddelerin hücre canlılığı üzerine etkilerini incelemek için sitotoksisite çalışması yapılmıştır. Buna göre, formülasyonlarda kullanılacak aktif madde derişimlerine karar verilmiştir. Lipozomların karakterizasyonu için parçacık boyutu (PS), polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyel (ZP), pH ve şekilleri incelenmiştir.

Hazırlanan lipozom formülasyonlarında,

a. Bu üç yaşlanma karşıtı aktif maddenin miktarlarını ölçmek için analitik yöntemler geliştirilmiş ve yöntemlerin validasyonu yapılmıştır. Bu doğrulanmış yöntemler, lipozomların kapsülleme verimliliğini ölçmek ve aktiflerin salım profillerini Franz difüzyon testleri ile izlemek için kullanılmıştır.

b. Karakterizasyon için lipozomların parçacık boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, pH ve şekilleri incelenmiştir.

c. Stabilite özelliklerini değerlendirmek için farklı koşullarda (4ºC, 25ºC ± % 65 bağıl nem ve 40ºC ± % 75 bağıl nem) saklanan lipozomların önceden belirlenmiş zaman noktalarında (0, 7, 30, 60, 90, 180 gün) karakterizasyon testleri tekrarlanarak izlenmiştir.

d. Formülasyonların güvenliliğinin test edilmesi için sitotoksisite çalışması yapılmıştır.

e. Etken maddelerin Franz difüzyon hücreleri kullanılarak yapay membrandan ve domuz derisinden in vitro permeasyonları birbirleriyle ve konvansiyonel krem formülasyonu ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

f. Yaşlanma karşıtı antioksidan etkinliğin incelenmesi için antioksidan aktivite testi gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

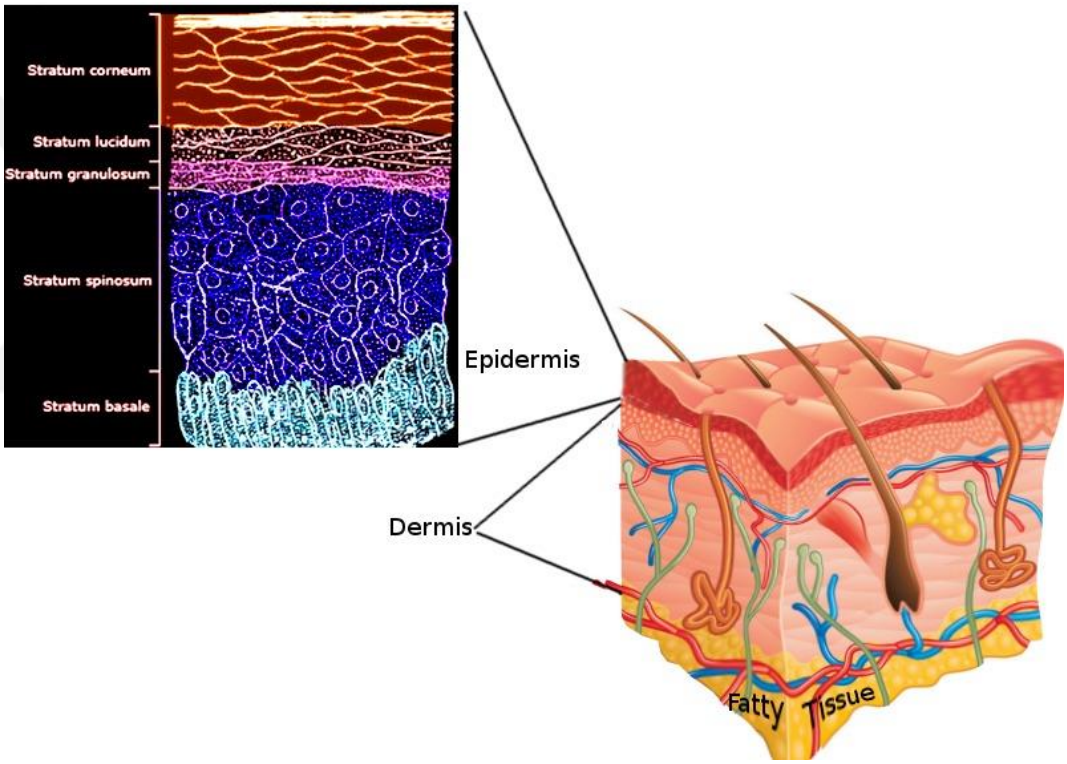
2.1. Deri

Deri, yaklaşık olarak $2m^2$'lik yüzey alanıyla insan vücudundaki en geniş organdır. Vücuda, su ve diğer bileşenlerin kaybını kontrol eden bir bariyer sağlar (15). Vücudu dışsal kimyasal ve fiziksel etkenlere karşı korur, metabolik süreçlerde yer alır, patojenik mikroorganizmalara karşı savunma sağlar ve immünolojik süreçlerde yer alır (15,16). Deri, dıştan içe doğru epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç farklı tabakadan oluşur. Her katmanın kendine özgü özellikleri ve işlevleri vardır. Derinin her tabakasının kalınlığı vücut bölgesine göre değişir ve epidermal ve dermal tabakaların kalınlığına göre sınıflandırılır. Ellerin avuçlarında ve ayak tabanlarında bulunan tüysüz deri en kalın deri olarak kabul edilir çünkü epidermis buralarda ek olarak stratum lucidum adlı bir tabaka içerir (17).

Cildin birçok işlevi vardır. Suya, mikroorganizmaların istilasına, mekanik ve kimyasal travmaya ve UV ışığından kaynaklanan hasara karşı bir bariyer görevi görür (18). Deri, dendritik epidermal T lenfositleri olan ve adaptif bağışıklık sisteminin bir parçası olan epidermisteki Langerhans hücrelerinin etkisiyle immünolojik savunmanın ilk bölgesidir (17). Deri, hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonlara hizmet ederken, sıcaklığı ve su kaybını düzenleyerek vücut homeostazını korur. Endokrin fonksiyonlar, güneşten gelen UV ışığının yardımıyla epidermisteki 7-dehidrokolesterolün D vitaminine dönüştürülmesinden sorumlu olan keratinositlerde D vitamini üretimini içerir. Keratinositler, D vitamini reseptörünü (VDR) eksprese eder ve ayrıca D vitaminini aktif formuna dönüştürmek için gereken enzimleri içerir. VDR'nin önemi, uyarılmasının epidermiste yukarı doğru hareket ederken keratinositlerin farklılaşmasında ve stratum bazale proliferasyonunda rol oynamasıdır. Derinin ekzokrin fonksiyonları ter ve yağ bezleri aracılığıyla gerçekleşir. Derinin bir diğer önemli rolü de nosiseptörlerin hareketleriyle dokunma, ısı, soğuk ve acı hissidir. Derinin genel görünümü, turgor ve diğer nitelikleri de vücudun sağlığı hakkında fikir verir (19,20,21).

İnsan derisinin karmaşık yapısı ve fizikokimyasal özellikleri onu dış etkenlere karşı etkili bir bariyer yapar ve insan vücudunun homeostazının korunmasına yardımcı olur (22). Bu görevi epidermis üstlenir. Epidermis, cildin en

yüzeysel tabakasıdır. Vücudumuzun dış yüzeyinde, birkaç katmana bölünmüş bir epitel dokusudur (23). Bu örtü, kişinin cildinin genel kozmetik görünümünü sağladığı için büyük önem taşımaktadır (18). Bu yapının en dış kısmında yer alan stratum corneum (SC) organelsiz keratinositlerle kaplıdır. Bu bariyer, su ve elektrolit kaybını önlemek için epidermal bir geçirgenlik bariyeri oluşturur (24). Şekil 2-1'de epidermis, epidermisin farklı katmanları ve epidermal bariyerin diğer yapısal bileşenleri sırasıyla aşağı doğru, granüler katman, dikenli katman, bazal katman olarak gösterilmiştir (25). Bu katmanların altında dermis başlar (26).



Şekil 2-1: Derinin yapısı (25)

2.1.1. Epidermis

Sağlıklı epidermis, katmanlı bir skuamöz epiteldir (27). Epidermisin %95'ini epidermal bazal membrandan geçen ve cildin yüzeyine doğru ilerleyen keratinosit hücreler oluşturur. Epidermis morfolojik olarak dört katmana ayrılır: stratum bazale veya stratum germinativum, stratum spinosum, stratum granulosum

ve stratum korneum. Epidermisteki diğer hücreler arasında melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri bulunur (17, 28,29).

15-20 kat tamamen korneositlerden oluşur. Kornifiye tabakanın alt kısmında hücreler birbirine yakın bir şekilde bitişikken, üst kısımda gevşek bir şekilde düzenlenirler (15).

Stratum bazale, diğer adıyla stratum germinativum, en derindeki tabakadır. Bazal lamina ile dermis tabakasından ayrılır. Hemidesmozomlar ile bazal tabakaya bağlanır. Bu katmanda bulunan hücreler, sürekli keratinositler üreten küboidalden sütunlu mitotik olarak aktif kök hücrelerdir. Bu katman ayrıca melanositler içerir (18).

Dikenli hücre tabakası olarak da bilinen 8-10 hücreli tabaka olan stratum spinosum, dışa doğru uzanan ve komşu hücrelere dezmozomlarla temas eden, bazen "dikenler" olarak adlandırılan sitoplazmik süreçlere sahip düzensiz, çokyüzlü hücreler içerir. Dendritik hücreler bu katmanda bulunabilir (18,30).

Stratum granulosum, 3-5 hücre katmanı, keratohyalin granülleri ve lameller granüller içeren elmas şekilli hücreler içerir. Keratohyalin granülleri, sonunda bir araya gelen, çapraz bağlanan ve demetler oluşturan keratin öncüleri içerir. Lamellar granüller, hücrelerin yüzeyine salgılanan ve hücrelerin birbirine yapışmasını sağlayan bir yapıştırıcı görevi gören glikolipidleri içerir (17).

Avuç içi ve ayak tabanlarındaki daha kalın deride bulunan 2-3 hücreli tabaka olan stratum lucidum, keratohyalinin bir transformasyon ürünü olan eleidinden oluşan ince ve şeffaf bir tabakadır (17).

Stratum corneum, 20-30 hücre katmanı, çekirdeksiz skuamöz hücreler olarak bilinen keratin ve ölü keratinositlerden oluşan pullu yapıdaki en üst katmandır. Bu, özellikle nasırlı deride, kalınlığı en çok değişen katmandır. Bu katman içinde, ölü keratinositler, ilk bağışıklık savunmamızın bir parçası olan defensinleri salgılar (17).

Epidermisin dış tabakasının kalınlığı, korneositlerin boyutu ve yüzeysel lipidlerin bileşimi, cildin yenilenme özelliklerini etkiler, bu da dermatolojik hastalıkların seyrine ve benzer şekilde iyileşme sürecine katkıda bulunur. Kalın epidermisi olan anatomik alanlar dış etkenlere karşı daha dirençlidir (31). Öte

yandan, yüz gibi nispeten ince bir kornifiye tabakaya sahip alanlar, zarar verici faktörlere karşı yüksek hassasiyet ve aynı zamanda bariyer işlevini çok hızlı bir şekilde yeniden kurma yeteneği ile karakterize edilir. Yüksek proliferatif aktivite, dolayısıyla epidermisin hızlı rejenerasyonu, yoğun vaskülarite, iyi hidrasyon ve birçok ter bezinin varlığı ile ilişkilidir (15, 32).

Epidermal bariyerin durumu, üretilen sebum miktarı, epidermis hidrasyonu, transepidermal su kaybı ve cildin yüzeyi ile vücudun içi arasındaki pH gradyanı gibi fiziksel özelliklerine bağlıdır (33). Yaş, cinsiyet, ırk, derinin anatomik alanı, hormonal denge, terlemenin yoğunluğu, cilt sıcaklığı ve ortam sıcaklığı, havanın nemi, yılın mevsimi gibi birçok bireysel ve çevresel faktör yukarıda belirtilen süreçlerin modifikasyonunu etkiler (34,35).

Boynuzsu tabakanın yüzeyi, epidermal bariyerin işleyişinde çok önemli bir rol oynayan lipid film ile kaplıdır. Bu lipid film, lipid mantosunun en büyük bölümünü oluşturan yağ bezleri tarafından salgılanan sebum ve epidermisin kornifiye tabakasının bir parçasını oluşturan epidermal lipidlerdir (36-38). Lipid mantosunun kalınlığı, belirli bir bölgedeki yağ bezlerinin sayısına bağlı olarak 0,5 µm ila 5 µm arasındadır (36).

Stratum bazale deride ve hiperproliferatif epidermiste yer alan sürekli bir tabakadır. Bazal hücreler küçük ve küboidaldir (10-14 nm) ve büyük, koyu renkli çekirdeklere, birçok ribozomlu yoğun sitoplazmaya ve yoğun filament demetlerine sahiptir (39,40).

Üst, sivri tabaka ve granül hücre tabakasının hücrelerinin sitoplazması ayrıca, lamellar granüller veya cisimler, membran kaplama granülleri veya Odland cisimleri olarak bilinen, ortalama 100-300 nm büyüklüğünde daha küçük lamellar granüller içerir (40).

Sivri tabakanın tepesindeki hücrelerde çokturlar ve granüler hücre tabakasına girerken hücrelerin etrafında göç ederler. Lipid bileşenlerini hücre içi boşluğa boşaltırlar, bariyer işlevinde önemli bir rol oynarlar ve stratum corneum içinde hücreler arası ilişkiyi desteklerler (24).

Epidermisin en dış tabakası, hücrelerin çekirdeklerini ve sitoplazmik organellerini kaybettiği stratum corneum'dur. Hücreler düzleşir ve keratin

filamentleri, keratin filament agregasyonundan sorumlu keratohyalin granülünün protein bileşeni olan filagrin etkisi altında disülfid çapraz bağlı makrolifler halinde hizalanır (41).

Epidermisin dış tabakasının hücreler arası matrisinin lipidleri, granüler tabakanın çok katmanlı Odland cisimcikleri tarafından sağlanan öncüllerinin dönüşüm sürecinde gelişir (42). Polar lipidler polar olmayanlara dönüştürülür, glikolipidlerin hidrolizi seramidleri oluşturur, fosfolipidler ise serbest yağ asitlerine metabolize olur. Bu olaylar, epidermal hücrelerin yüzeyine paralel olarak yerleştirilmiş lamellerden meydana gelen bir yapının oluşmasıyla sonuçlanır (43,44). Hücreler arası lipidler esas olarak sfingolipidler veya seramidler (%45-50), kolesterol (%20-25), doymuş serbest yağ asitleri (%10-15) ve az miktarda polar olmayan lipidlerdir. Epidermiste başlıca rolü oynayan seramid, linoleik asittir (42,45). Diğer yandan serbest yağ asitleri arasında zincir uzunluğu C22 ve C24 olanlar baskın görünmektedir. Matriks bileşenlerinin yaklaşık %2-5'i, epidermal hücreler arasındaki dezmozom bağlarını sindiren proteolitik enzimlerin inhibisyonundan sorumlu olan kolesterol sülfattır (43-45).

2.1.1.1. Keratonisitler

Keratinositler, epidermisi meydana getiren baskın hücre tipidir ve bazal tabakadan köken alır, keratin üretir ve lipidleri üretip salgılayarak epidermal su bariyerinin oluşumundan sorumludur. Keratinositler ayrıca, D vitamini oluşturmak için UVB ışığı ile kolesterol öncüllerinin aktivasyonu ile kalsiyum emilimini de düzenler (17).

2.1.1.2. Melanositler

Melanositler, nöral krest hücrelerinden elde edilir ve esas olarak cildin pigmentinden sorumlu olan melaninin üretiminden sorumludurlar. Stratum bazale hücreleri arasında bulunurlar ve melanin üretirler. UVB ışığı, yerleşik bir güneş koruyucu görevi görerek UV radyasyonuna karşı koruyucu olan melanin salgısını uyarır. Melanin, melanosit hücrelerinde melanozom adı verilen lizozom benzeri organellerde sentezlenir. Melanin, tirozinaz enzimi tarafından tirozinin DOPA'ya dönüştürülmesi sırasında üretilir. Melanin daha sonra melanositlerden komşu epidermal hücrelere uzanan uzun süreçlere dayanan bir süreçle hücreden hücreye

gider. Melanositlerden gelen melanin granülleri, uzun süreçler yoluyla bazal keratinosit sitoplazmasına aktarılır. Melanin, "pigment bağışı" ile komşu keratinositlere aktarılır. Melanin hücrelere yerleşerek hücrelerin UV ışınlarının olumsuz etkilerinden korunmasına yardımcı olur (17).

2.1.1.3. Langerhans Hücreleri

Langerhans hücreleri, dendritik hücreler, derinin ilk hat savunucularıdır ve antijen sunumunda önemli bir rol oynarlar (46). Derideki mikrobiyal antijenleri alarak antijen sunan hücrelere dönüşen ve T hücreleri ile etkileşerek bağışıklık sağlayan dendritik hücrelerdir. Bu hücrelerin, öncelikle stratum spinosumda bulunan, görselleştirmek için özel lekelere ihtiyacı vardır. Langerhans hücreleri, kemik iliğinin CD34 pozitif kök hücrelerinden türetilen mezenkimal kökenlidir ve mononükleer fagositik sistemin bir parçasıdır. Birbeck granülleri, tenis raketi şeklinde sitoplazmik organeller içerirler. Bu hücreler majör doku uygunluk kompleksi (MHC I ve MHC II) moleküllerini eksprese eder, derideki antijenleri alır ve lenf düğümüne taşınır (17).

2.1.1.4. Merkel Hücreleri

Merkel hücreleri, bazal membranın hemen üzerinde, stratum bazalede bulunan oval şekilli modifiye epidermal hücrelerdir (17). Bu hücreler, mekanoreseptörler olarak duyusal bir işlev görür ve avuç içi, ayak tabanları, ağız ve genital mukozada da bulunsalar da en çok parmak uçlarında bulunurlar. Dezmozomlarla bitişik keratinositlere bağlanırlar, ara keratin filamentleri içerirler ve zarları derideki serbest sinir uçlarıyla etkileşime girer. Fetüsün yaklaşık 16. haftasında parmak uçlarının, dudakların, diş etlerinin, tırnak yatağının ve diğer birkaç bölgenin tüysüz cildinde oluşurlar (47).

2.1.1.5. Doğal Nemlendirici Faktör (NMF)

Temel işlevi yeterli cilt hidratasyonunu korumak olan Doğal Nemlendirici Faktör (NMF) serbest amino asitlerden, bu amino asitlerin pirolidon karboksilik asit (PCA), ürokanik asit gibi türevlerinden ve inorganik tuzlar, şekerler, laktik asit ve üreden oluşur. NMF bileşenleri, atmosferden su çeken ve bağlayan ve onları korneositlere çeken yüksek verimli nemlendiricilerdir. Bu işlem, korneositlerin düşük nemli ortamlarda yeterli su seviyelerini korumasını sağlayan %50 bağıl nem

kadar düşük olabilir. Su emilimi o kadar verimlidir ki, NMF çoğunlukla emdiği suda çözülür. Hidratlı NMF, özellikle nötr ve esansiyel amino asitler, keratin lifleri ile iyonik etkileşimler oluşturarak lifler arasındaki moleküller arası kuvvetleri azaltır ve böylece stratum corneum'un esnekliğini arttırır. Bu esneklik, cildin sağlıklı ve esnek görünmesine yardımcı olur ve mekanik stres nedeniyle çatlama veya dökülmeyi önler (48).

Epidermal bariyerin bütünlüğü cildi aşırı su kaybına karşı korur ve epidermisin doğru hidrasyonunun korunmasını sağlar. Epidermisin SC tabakası sayesinde su birikir ve bu tabakadaki su miktarı cilt hidrasyonu olarak tanımlanır (49). Doğru nem seviyesi, epidermis, dermis ve yağ bezlerinin alt tabakalarından sağlanan su miktarı, ayrıca buharlaşma yoluyla kaybedilen su miktarı ve boynuzsu tabakanın su biriktirme kabiliyeti gibi faktörlerden etkilenir. Bu tabakadaki su tutulması, hücre dışı matrisin lipidlerinin ve hücrelerin protein kaplamasının varlığından da etkilenir (50).

Stratum corneum tabakası, cilt yüzeyi ile epidermisin alt tabakaları arasındaki su gradyanını korur. Bazal tabakadan epidermis yüzeyine geçişleri ile keratinosit hidratasyonu azalır (36). Su, SC tabakasının toplam kütlesinin yaklaşık %15-20'sini oluşturur ve çoğunlukla korneositlerin içinde birikir, epidermisin canlı tabakalarında ise kütlesinin %70'ini su oluşturur (42). Boynuzsu tabakanın en üst kısmı en az su içeriğine sahip kısımdır ve su içeriği üzerinde dış faktörlerin büyük etkisi vardır. Kalınlığı 30 µm olan boynuzsu tabakanın kalınlığı nemlendirmeden sonra 40 µm'ye kadar yükselir (43). Epidermisin en derin kısmı daha fazla su içerir ve bu nedenle dış ortamın etkisi önemsizdir. Orta alan ise su birikimini düzenleme olasılığı en yüksek olan bölgedir. Korneositlerin içinde bulunan yüksek konsantrasyonda NMF ile karakterizedir (50). Doğal nemlendirme faktörü, epidermisin doğru hidratasyonunun ve cilt plastisitesinin korunmasından sorumludur. Boynuzsu tabakanın kuru kütlesinin %10-30'unu oluşturur ve çoğunlukla serbest amino asitlerden ve filagrin proteolizinin ürünleri olan ürokanik asit (UCA) ve pirolidon karboksilik asit gibi metabolitlerinden oluşur. Boynuzsu tabakanın higroskopik özelliklere sahip diğer bileşenleri, laktatlar, üre, proteinler, sakkaritler, organik asitler ve ter bezlerinden salgılanan çok sayıda elektrolitin yanı sıra yağ bezleri tarafından iletilen gliseroldür (31, 42, 50).

Epidermisin boynuzsu tabakasının hücre içi boşluğunun lipidleri, çoğunlukla anatomik ve biyokimyasal yapıları sayesinde epidermisten aşırı su kaybını önler ve bu da onlarnı bir bariyer rolü oynamalarını sağlar (51). Birbirine sıkı sıkıya bağlı olarak paketlenmiş paralel plakalardır ve boynuzsu tabakadan su buharlaşmasına karşı koruma sağlarlar. Seramidler, boynuzsu tabakada su tutulmasını artırmada rol oynar (51,52). Hücre içi matrisin seramid, kolesterol ve serbest yağ asitlerinin içeriğindeki azalma cilt nemini azaltır (50). Hyaluronik asit hidrofilik özellikleri sayesinde dermis içindeki su içeriğinin korunmasında rol alır. Hyaluronik asit küçük miktarda boynuzsu tabakanın hücre içi matrisinde de bulunur (43).

Epidermis hidrasyon değerleri anatomik bölgeye göre değişir. En yüksek değerler yüz derisinde, eklem çukurlarında, daha düşük değerler ön kollarda, en düşük değerler ise diz bölgesinde bulunabilir (53). Bu çoğunlukla epidermisin kalınlığına ve yağ ve ter bezlerinin konumuna bağlıdır (31,50). Nem seviyesi, ortam nemine ve sıcaklığa bağlı olarak da değişir. Bu parametreler, epidermis ve çevre arasındaki hidrasyon gradyanının değişimi üzerinde bir miktar etkiye sahip olarak, SC tabakasından su tutulmasını ve buharlaşma derecesini etkiler (53,54). Ayrıca nem değeri tüketilen gıdaların türünden de etkilenebilir. Çalışmalardan biri, doymuş veya tekli doymamış yağ asitlerinden zengin diyetin bir sonucu olarak epidermal hidrasyonun azaldığını göstermiştir (55).

Deriden su kaybı, terleme ve transepidermal pasif difüzyonun salgılanmasının bir sonucudur. Epidermis yoluyla su kaybı TEWL değeri ile tanımlanır ve epidermisin nem seviyesini etkiler (56, 57). Transepidermal su kaybı, epidermis su tabakasının bütünlüğünü yansıtan bir parametredir ve epidermis bariyerinin hasarının çok hassas bir göstergesidir (31, 33). Stabil ortam koşullarında, TEWL cilt bölgesine bağlı olarak 4-10 $g/h/m^2$ civarında salınım yapar, ancak epidermis hasar gördüğünde 30 kat daha yüksek bir değere kadar çıkabilir (33). TEWL değeri, cilt sıcaklığı, ortam sıcaklığı ve nemi, cilt damarlarından kan akışı, epidermisin yenilenme hızı, boynuzsu tabakanın kalınlığı, lipid içeriği, ter bezlerinin sayısı ve aktivitesi gibi faktörlerin etkisi altında bile değişir (31, 33, 54, 58). Bu parametre, düşük ve yüksek su konsantrasyonu arasındaki geçiş yeri olan boynuzsu tabaka ve granüler tabakanın hücreleri

arasındaki bağlantıların doğru yapısına bağlıdır. Bu bağlantılar, suyun ve içinde çözünen diğer maddelerin epidermisin canlı katmanlarına geçişini düzenler (42). Transepidermal su kaybı değerleri cinsiyete bağlı olmadığı bilinmekle birlikte (34), bazı çalışmalar bu parametrenin erkeklerde daha yüksek değerlerde olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca 60 yaşın üzerindeki kişilerde daha düşük TEWL değerleri görülmektedir (59). Bu parametre aynı zamanda epidermis eksfoliyasyonunun düzenlenmesini ve keratinizasyona eşlik eden enzimatik fonksiyonları da etkiler. Su kaybı ne kadar yoğun olursa, deride aşırı pul pul dökülmeye sebep olabilecek keratinizasyon süreci o kadar yoğun olur (42,60).

2.1.2. Dermis

Yağ tabakası ile epidermis arasındaki dermis, bazal membran seviyesinde epidermise bağlanır. Dermis ter bezlerini, kılları, kıl köklerini, kasları, duyu nöronlarını ve kan damarlarını barındırır. Ana işlevleri, koruma ve onarım, cilt rengi, sıcaklık kontrolleri, nem tutma, bağışıklık sağlama, cilt organellerini depolama, emilim ve D vitamini sentezidir (61). Derinin bu orta tabakası, minimum miktarda kolajen ve bol kan dolaşımı olan bağ dokusu içerir. Bu tabakanın nemi ve kalınlığı yaşla birlikte azalır. Dermiste bulunan hücre tipleri fibroblastlar, mast hücreleri ve histositlerdir. Saç kökleri, sinirler, lenf damarları ve ter bezleri de cildin dermal tabakasında bulunur. Bu kısım sinir ve kan damarları açısından zengindir (62, 63).

Dermis üç tabakadan oluşur. Papiller tabaka üst tabakadır, daha incedir, gevşek bağ dokusundan oluşur. Subpapiller tabaka, papiller tabakanın altındaki alandır ve papiller tabakada olduğu gibi burada da aynı bileşenler bulunur. Retiküler tabaka, dermisin en önemli kısmıdır ve çok yoğun bağ dokusu ve lif bileşenlerinden oluşur. Retiküler tabaka daha derindeki tabakadır, daha kalındır, daha az hücreseldir. Dermisin alt kısmı deri altı yağ dokusu ile temas halindedir (64).

2.1.3. Hipodermis

Hipodermis dermise kadar derindir ve ayrıca subkutan fasya olarak da adlandırılır. Derinin en derin tabakasıdır ve kıl folikülleri, duyusal nöronlar ve kan damarları gibi bazı deri ekleriyle birlikte yağ lobülleri içerir. Dermisin altındaki bu

yağ tabakası, hayati iç organları mekanik travmalardan koruyan bir tampon tabakası ve ayrıca soğuğa karşı koruyan bir yalıtım tabakası görevi görür. Ayrıca burada bulunan yağ, vücut için bir enerji deposudur. Yağın miktarı ve dağılımı büyük ölçüde kalıtsal faktörlere, diyete ve fiziksel aktiviteye bağlıdır (17).

2.1.4. Yağ Bezleri

Yağ bezleri, deride, memelilerin saçlarını ve derisinin yağlanmasını sağlayan, sebum adı verilen yağlı veya mumsu bir madde salgılamak için bir kıl folikülüne açılan mikroskobik ekzokrin bezlerdir. Sebum yapışkan bir sıvıdır ve polar olmayan lipidlerin bir karışımıdır. Trigliseritler (~%16), serbest yağ asitleri (~%33), mum esterleri (~%26), skualen (~%12), kolesterol esterleri (~%3) ve kolesterolden (~%1.5) oluşur. Baskın yağ asitleri, C16 ve C18 karbon zinciri uzunluğundaki esansiyel yağ asitleridir, burada baskın asit oleik asittir (65). Doymuş yağ asitleri arasında en yaygın olanı palmitik asittir. Sebum bileşimi nispeten sabittir. Sebum bileşimindeki en büyük değişiklikler, ergenlerde, trigliseritlerin serbest yağ asitlerine yoğunlaştırılmış hidrolizi sırasında gözlenir (15). Sebum üretimi, bireysel özellikler ve çevresel faktörler tarafından koşullandırılan çok dinamik bir süreçtir. Gözlenen sebum üretimi erkeklerde kadınlardan daha fazladır. Sebum üretimi, yağ bezlerinin yoğunluğuna, konumuna ve aktivitesine bağlıdır. Kafa derisi, yüzün T bölgesi, sternum veya interskapular alanlar gibi alanlarda yoğunlukları cildin santimetre karesinde 900 adettir, ancak diğer yerlerde santimetre karede 100'den az yağ bezi gözlenir (66).

Sebum, epidermal lipidlerin bütünlüğünü korumaya yardımcı olan üç boyutlu yapılarının oluşturulmasında rol alır (67, 68). Hem proinflamatuar hem de antiinflamatuar özelliklere sahip olan patojenik mikroorganizmaların çoğalmasına karşı koruyucu bir tabaka oluşturur (69). Sebum, aşırı neme ve ortam sıcaklığındaki değişimlere karşı bir tür yalıtım oluşturur (67). Ayrıca epidermisin su bağlama kapasitesinin korunmasına yardımcı olur (31,69). Uygun sebum üretimi, kornifiye tabakanın yüksek düzeyde nemlenmesi ile ilişkilidir (34). Fizikokimyasal özellikleri sayesinde cilde uygulanan bileşiklerin seçici geçirgenliğini etkiler (36). Ayrıca, antioksidan özelliklere sahiptir ve cildi sebasöz trombosit aktive edici asetilhidrolaz II'nin işlev bozukluğuna bağlı UVB radyasyonundan korur (44).

Kornifiye tabakanın lipitleri, deri yüzeyinden çeşitli bileşiklerin emiliminin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar (36). Epidermis yoluyla ve deri uzantıları yoluyla olmak üzere iki şekilde emilim vardır. Ana yol, epidermis yoluyla seçici emilimdir. Hücre dışı lipidlerin zıt elektrik yükünün katmanlı, çift katmanlı yapısı, lipofilik maddelerin çözülmesini kolaylaştırır. Hidrofobik özellikleri aşırı su kaybını ve hidrofilik maddelerin çözünmesini engeller. Maddelerin cilt yüzeyinden emilimi büyük ölçüde stratum corneum tabakasının korneositlerinin boyutuna bağlıdır. Emilim hücreler arası boşluğun kapasitesi ile doğru orantılı ve hücrelerin boyutu ile ters orantılıdır (70). Molekül ağırlığı 500 Da'nın altında olan polar olmayan bileşikler epidermisten kolayca geçer. Maddelerin deri ekleri (ter bezleri, yağ bezleri, saç kökleri) yoluyla emilimi sadece mütevazı bir ölçüde gerçekleşir. Daha az seçicilik ve daha büyük molekülleri geçirme olasılığı nedeniyle hızlı nüfuz yolu olarak adlandırılır. Bu nedenle, yüz veya gövdenin üst kısmı gibi birçok ter bezi bulunan alanlar, potansiyel olarak proinflamatuar maddelerin absorpsiyonuna daha fazla maruz kalır (31).

2.1.5. Ekrin Bezleri

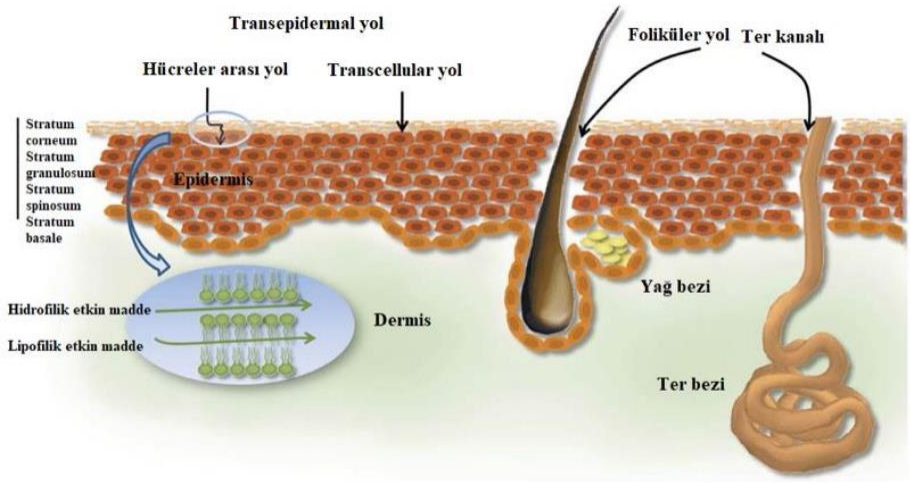
Ekrin ter bezleri, vücudun her yerinde, en çok da ayak tabanlarında bulunan basit, sarmal, boru şeklindeki bezlerdir. İnce deri vücudun çoğunu kaplar ve ter bezlerinin yanı sıra kıl folikülleri, kıl toplayıcı kaslar ve yağ bezleri içerir (71). Ekrin ter bezleri, buharlaşmayla ısı kaybı yoluyla termoregülatuar bir işlev görür. Vücudun iç sıcaklığı yükseldiğinde, ter bezleri cilt yüzeyine su bırakır. Orada hızla buharlaşır, ardından cildi ve altındaki kanı soğutur; bu, insanlarda termoregülasyonun en etkili yoludur (72). Ekrin ter bezleri ayrıca iyon ve azotlu atık atılımına katılır. Duygusal veya termal uyaranlara yanıt olarak ter bezleri günde en az 500 mL ila 750 mL ter üretebilir (71).

Ter bezleri cilt hasarında yenileyici bir rol oynar. Retiküler dermise uzanan ikinci derece deri yanıklarında epitel rejenerasyonu, kıl folikülleri, yağ bezleri ve ter bezleri dahil olmak üzere deri ekleri yoluyla gerçekleşir. Bu uzantıları çevreleyen epitel hücreleri, 1 ila 3 hafta sürebilen bir süreçte yeni bir epitel oluşturmak için ilerleyen daha fazla epitel hücresi üretir (71).

2.2. Deriden Geçiş Yolları

Deri, üç ana taşıma yolunun bulunduğu çok katmanlı canlı bir zar olarak kabul edilebilir. Deriden geçiş yolları transselüler (hücrelerinden içinden geçerek), interselüler (cilt hücreleri arasından geçerek) ve saç foliküllerinden, ter bezlerinden ya da yağ bezlerinden geçerek taşıma (Şekil 2-2) olarak sınıflandırılabilir (73). Saç foliküllerinden, ter bezlerinden ya da yağ bezlerinden geçerek taşıma, en hızlısı olmasına rağmen, derinin çok küçük bir kısmı ile sınırlıdır (<%0,1) (74).

Maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak farklı taşıma yolları mevcuttur. Cilt, hem nemden (su) hem de sebumdan (yağlı maddeler) oluşur. Fizyokimya, madde konsantrasyonu, yayılabilirlik ve maruz kalma yolu gibi faktörler transdermal absorpsiyonu etkiler (75). Suda çözünür maddelerin esas olarak boynuzsu tabakadaki hidratlı keratinositler yoluyla taşındığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Mekanizma henüz tam olarak anlaşılmamış olsa da, lipofilik maddelerin bunun yerine hücreler arası lipidler yoluyla difüze olduğu varsayılmaktadır. Genel olarak, maddelerin stratum corneum boyunca difüzyonu pasiftir, yani hücrelerden enerji gerektirmez (76).



Şekil 2-2: Deriden geçiş yolları (73)

İlacın deriye uygulanmasından sonra ilk aşama madde boynuzsu tabakanın dış tabakasında partisyonudur. Daha sonra epidermisten maddenin pasif difüzyonla geçişi gerçekleşir. Ardından, uygulanan maddenin dermise penetrasyonu gerçekleşir. Son aşama, penetre olan madde deri altındaki damarlardan emilerek sisteme dolaşıma katılmasıdır (77).

2.2.1. Deriden Geçiş Mekanizmaları

İlaç emilimi, ilacın fizikokimyasal özellikleri, formülasyonu ve uygulama yolu ile belirlenir. İlacın yanı sıra diğer bileşenlerden oluşan dozaj formları (örn. tabletler, kapsüller, solüsyonlar), çeşitli yollarla (örn., oral, bukkal, dil altı, rektal, parenteral, topikal, inhalasyon) verilmek üzere formüle edilmiştir (78).

Hücre zarı, polar maddeler ve makromoleküller için bariyer görevi görürken, küçük polar moleküller ve su gibi maddeler için kısmi geçirgendir. Maddeler hücre zarından çeşitli transport mekanizmaları ile geçmektedirler. Transepidermal geçiş sırasında dört farklı transport mekanizması bulunmaktadır. Bu mekanizmalar, aktif transport, pasif transport, endositoz ve transsitozdur (79).

Deriden ilaç geçişinde ana bariyer olan boynuzsu tabakadan geçiş temel olarak pasif difüzyon ile gerçekleşir. Yüksüz ve küçük çaplı moleküllerin geçişi pasif transport ile gerçekleşir. Moleküllerin büyüklüğü ve maddenin lipit tabakalarındaki çözünürlüğü, ilaç moleküllerinin zarlardan geçiş hızını etkileyen faktörlerdir. Küçük partikül boyutuna sahip ya da apolar maddelerin geçişi hızlı olurken, daha büyük partikül boyutuna sahip maddelerin geçişi yavaştır (80).

Aktif transport aracılığıyla geçiş, polar ve iyonik moleküllerin geçişinde gerçekleşir. Aktif transport konsantrasyon gradientine karşı, pasif difüzyon konsantrasyon gradienti ile gerçekleşir. Endositoz ya da transitoz ile makromoleküllerin geçişi sağlanır. Endositoz sırasında, hücre zarı makromoleküllerin etrafını çevirir. Makromoleküller, hücredeki lizozomal enzimler yardımıyla parçalanır. Transsitoz ise, epitel hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere makromoleküller bağlanmasıyla ve ardından reseptör-makromolekül kompleksinin taşıyıcı içerisinde birleşip hücre dışına taşınmasıyla gerçekleşir (81).

Bir ilaç molekülünün cildin değişik tabaları içerisine penetrasyonu kütan penetrasyon olarak adlandırılır. Perkütan ya da transdermal absorpsiyonda, ilaç derinin içine girmenin yanında, deri içindeki damarlar içine de girer. Formülasyonun etkisi, derinin fizyolojisi, ilaç maddesinin fizikokimyasal özellikleri ve biyolojik etmenler, transdermal absorpsiyonu etkileyen temel faktörlerdir (74). Transdermal sistemler, ilaçların deriden geçmesini sağlamak için yeterli bir ilaç yükü ile doyurulmuş deri boyunca pasif difüzyon için maksimum termodinamik itici gücü sağlayacak şekilde formüle edilmelidir (82).

2.2.2. Deriden Geçişi Arttırmaya Yönelik Yaklaşımlar

Boynuzsu tabakanın bariyer özelliklerini değiştirmek için kullanılan teknolojiler pasif (kimyasal) veya aktif (fiziksel) metodlar olarak sınıflandırılır. Deri geçirgenliği için aktif yöntemler arasında ultrason, elektrik destekli yöntemler (elektroporasyon ve iyontoforez), hıza dayalı cihazlar (toz enjeksiyon, jet enjektörler), termal yaklaşımlar (lazerler ve radyo frekanslı ısıtma) ve mikroiğneler (MN) ve bant gibi mekanik metodolojiler bulunur. Bu yaklaşımlar, deriye daha geniş bir ilaç sınıfının verilmesine izin verir. Aktif yöntemler, deri boyunca ilaç taşınması için bir itici güç olarak veya boynuzsu tabakayı fiziksel olarak bozarak harici enerjinin kullanılmasını içerir (83, 84).

Pasif yöntemler, stratum corneum yapısını değiştirmek için yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasını ve formülasyonun optimizasyonunu içerir (85,86,87). Pasif yöntemlerin, kimyasal güçlendiriciler ve emülsiyonlar ile transdermal yamalar içine dahil edilmesi nispeten kolaydır (88). En yaygın olarak kullanılan pasif yaklaşımlardan biri, ilacın deriden geçişini kolaylaştıran kimyasal penetrasyon arttırıcıların kullanılmasıdır (89). Penetrasyon arttırıcıların stratum corneum lipid çift katmanlarının akışkanlığının arttırılması, hücreler arası proteinlerle etkileşim, hücreler arası lipitlerin bozulması veya ekstraksiyonu, ilacın termodinamik aktivitesinin artması ve stratum corneum hidratasyonunun arttırılması gibi çeşitli etki mekanizmaları vardır. Birkaç tip penetrasyon arttırıcı bilinmektedir ve etki mekanizmalarından ziyade kimyasal yapılarına göre birkaç gruba ayrılabilirler (90). Yaygın olarak araştırılan penetrasyon arttırıcıların örnekleri alkoller, sülfoksitler, azon, pirolidonlar, uçucu yağlar, terpenler ve terpenoidler, yağ asitleri, su ve üredir (91). Bununla birlikte, penetrasyon

arttırıcıların en büyük sınırlaması, etkinliklerinin genellikle cilt tahrişi oluşumu ile yakından ilişkili olmasıdır (90). Teknolojideki son gelişmeler, penetrasyon arttırıcılar alanına proniozomlar ve mikroemülsiyon jeller gibi yarı katı araçların yeni varyasyonlarını getirmiştir (88). Proniozomlar iyonik bazlı olmayan yüzey aktif madde veziküllerdir, ilaç salınımı ve deri yoluyla nüfuz etmeden önce hidratasyon gerektirebildikleri için "kuru niozomlar" olarak bilinirler. Hidratasyon üzerine proniozomlar, stratum corneum boyunca difüzyon yapabilen ve daha sonra ilacın vezikül/stratum corneum yüzeyinde yüksek bir termodinamik aktivite gradyanına neden olan hücre yüzeyine yapışabilen niozomlara dönüştürülür, böylece penetrasyon için itici güç görevi görür (88,92). Penetrasyon arttırıcılarla ilgili sınırlamalardan bazıları, zayıf etkinlik ve güvenliktir. Deri boyunca taşımayı artırma yetenekleri düşük ve değişkendir (92,93). Güvenlik hususları ile ilgili olarak, penetrasyon arttırıcıların sınırlı sayıda vakada lokal inflamasyon, eritem, şişme ve dermatit dahil olmak üzere potansiyel olarak cilt tahrişine neden olduğu gösterilmiştir. Pasif yöntemlerden formülasyon optimizasyonu, ilaç molekülünün güvenli bir ilaç taşıyıcı sistem içerisinde taşınmasını ifade eder. Bu yöntemle ilacın lipozom, nanopartikül gibi bir ilaç taşıyıcı sistem ile biyoyararlanımının arttırılması mümkündür (94).

2.3. Deri Yaşlanması

Vücudun dış çevreye maruz kalan en geniş organı olan cilt, hem iç hem de dış faktörlere maruz kalmaktadır. Cilt yaşlanması, iç ve dış faktörlerin neden olduğu karmaşık bir biyolojik süreçtir (1). İçsel yaşlanma, ince, kuru cilt, ince kırışıklıklar ve kademeli dermal atrofi ile sonuçlanan kaçınılmaz bir fizyolojik süreçtir; dışsal yaşlanma ise hava kirliliği, sigara, kötü beslenme ve güneşe maruz kalma gibi dış çevre faktörlerinden kaynaklanır ve sonuç olarak kaba kırışıklıklar, elastikiyet kaybı, gevşeklik ve kaba dokulu görünüm ortaya çıkar (95). Özellikle, ultraviyole (UV) radyasyonuna uzun süreli maruz kalma, dış cilt yaşlanmasının birincil faktörüdür ve fotoyaşlanma olarak adlandırılır. Bu yaşlanma süreçlerine kutanöz hücrelerde fenotipik değişikliklerin yanı sıra cilde gerilme kuvveti, elastikiyet ve hidrasyon sağlamak için gerekli olan kollajenler, elastin ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matris bileşenlerinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler eşlik eder (95, 96). Cilt elastikiyeti kaybı zamanla ciltte sarkmaya yol

açar (96). Epidermal dönüşüm hızının yavaşlaması ve hücre döngüsünün uzaması, yaşlı erişkinlerde daha yavaş yara iyileşmesi ve daha az etkili deskuamasyon ile sonuçlanır (97).

İçsel cilt yaşlanması, kronolojik olarak fizyolojik bir değişim sürecidir. İçsel yaşlanmaya uğrayan cilt için en dikkat çekici histolojik değişiklikler bazal hücre tabakasında meydana gelir. Araştırmalar, bir kişi yaşlandıkça bazal tabakadaki hücrelerin çoğalmasının azaldığını ortaya koymaktadır. Zamanla epidermis daha ince hale gelir ve dermis ile epidermis arasındaki temas yüzey alanı azalır, bu da epidermise besin sağlamayan alanın küçülmesiyle ve bazal hücre proliferasyonunun daha da zayıflaması ile sonuçlanır (98,99). Vaskülarize dermis tarafından avasküler epidermise besin desteği azalır. Keratinositler, fibroblastlar ve melanositler dahil olmak üzere hücrelerin proliferatif yeteneğinin azalması sürecine hücresel yaşlanma denir. Farklı yaşlardaki insan donörlerinden alınan deri örneklerinde, dermal fibroblastlarda ve epidermal keratinositlerde yaşlanma belirteci b-galaktosidaz ekspresyonunda yaşa bağlı bir artış görülmüştür, bu da yaşlı derinin daha fazla senesent hücre içerdiğini göstermektedir (100).

Ek olarak, araştırmalar ışıktan korunan yaşlı cildin dermisi, ışıtan korunan genç cilde göre yalnızca daha az mast hücresi ve fibroblast değil, aynı zamanda seyrekleşmiş kolajen lifleri ve elastik lifler de göstermiştir. Fibrilin pozitif yapıların belirgin bir kaybının yanı sıra azalan kolajen tip VII (Col-7) içeriği, yaşlanan cildin dermis ve epidermisi arasındaki bağı zayıflatarak kırışıkların artmasına yol açar (101,102). İçsel faktörlerle yaşlanmaya uğrayan ciltte, sadece elastin, fibrillin ve kollajenler dahil olmak üzere lifli hücre dışı matris bileşenlerinin değil, aynı zamanda oligosakaritin de dejenere olmakta ve bu da cildin bağlı suyu tutma yeteneğini negatif yönde etkilemektedir (103).

Derinin içsel yaşlanması algılanamayacak kadar yavaş hareket eder ve popülasyonlar, aynı etnik kökene sahip bireyler ve aynı kişinin farklı bölgeleri arasında önemli farklılıklar gösterir. Esasen içsel cilt yaşlanması ancak oldukça ileri yaşlarda görülebilir ve soluk, daha kuru, daha az elastik ve ince kırışıklı cilt ile karakterizedir. Yüzdeki ek deri altı değişiklikler de belirginleşmiş ifade hatlarına yol açar (104,105).

İçsel faktörlerin yanı sıra güneşe maruz kalmanın da cilt yaşlanmasına yol açtığı bilinmektedir (104). UV radyasyonuna maruz kalma, dış kaynaklı cilt yaşlanmasının birincil faktörüdür ve yüzdeki yaşlanmanın yaklaşık %80'inden sorumludur (105). İçsel faktörlerle yaşlanmış ciltteki daha ince epidermisin aksine, UV ışınlı epidermis kalınlaşır (106). Epidermisin en dış tabakası olan stratum corneum, korneosit dezmozomlarının parçalanmaması nedeniyle etkilenir ve kalınlaşır. Epidermal keratinositlerin farklılaşma sürecinin UV radyasyonu ile bozulması ile uyumlu olarak, stratum corneum'da farklılaşma belirteci involukrin ekspresyonu artar. Bazal hücrelerde, hücre dışı matris proteinleri ile etkileşime giren ve epidermal kök hücre belirteçlerinden biri olarak kabul edilen hücre-yüzey proteini b1-integrin ekspresyonu büyük ölçüde azalır, bu da yaşlı bazal keratinositlerdeki proliferasyonun da bozulduğunu gösterir (107, 108).

UV ışınlarına maruz kalan cilt bölgelerinde keratinositlerde tip VII kollajen ekspresyonu azalır. Tip VII kollajen, dermal-epidermal bileşkedeki sabitleyici fibrillerdir. Üretimindeki azalma, dermis ve epidermis arasındaki zayıflamış bağlantı nedeniyle kırışıklıkların artmasına sebep olur (109). Çalışmalar, fotoyaşlanmış ciltte kolajen yıkımının artması nedeniyle kolajen tip I'in azaldığını göstermiştir. Çeşitli matris metalloproteinazlar (MMP'ler), serin proteazlar ve diğer proteazlar bu bozunma etkinliğine katılır (109, 110). Fotoyaşlanmış ciltte, dermisin derinliklerinde anormal elastik doku birikir. Bu duruma solar elastoz adı verilir (111). UV maruziyeti, elastin ekspresyonunu 4 kat artırır, ardından yukarıda bahsedilen proteazlar tarafından elastik lif bölünmesi ile karakterize edilen elastoz meydana gelir, bu da kesik elastik liflerin şiddetli bir şekilde birikmesine neden olur. MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, nötrofil serin proteazları katepsin G ve insan lökosit elastazının elastini ayrıştırdığı bilinmektedir. Son araştırmalarda, fotoyaşlanmanın tropoelastin moleküllerinin N-terminal ve merkezi kısımlarını enzimatik bölünmeye daha duyarlı hale getirdiğini ve dolayısıyla elastinin yaşa bağlı bozunmasını hızlandırdığını bulunmuştur (95, 112).

Ayrıca, yaşlanma ile birlikte derinin anjiyojenik kapasitesi azalır. Bu durum, adezyon moleküllerinin anormal ekspresyonu ve bozulmuş vazodilatör fonksiyon dahil olmak üzere endotel disfonksiyonundan kaynaklanır (113).

Eksojen faktörler cilt fizyolojisini kalıcı olarak etkiler. Dış yaşlanmanın en büyük nedeni, birikmiş ve korunmasız güneş ışığına maruz kalmadır. Fotoyaşlanma güneş ışığından kaynaklanır. Bu durum büyük ölçüde yüz, boyun, eller ve daha az alt kol ile bacaklarla sınırlıdır. Yüz derisinin yaşlanmasının %80'den fazlası kronik UV'ye maruz kalma nedeniyle oluşmaktadır. Maruz kalma ayrıca güneş yanığı, bronzlaşma, iltihaplanma, bağışıklık sisteminin baskılanması ve dermal bağ dokusunun hasar görmesine neden olabilir. Dıştan yaşlanmış cildin özellikleri (çoğunlukla UV kaynaklı) kaba kırışıklıklar, kaba doku, benekli pigmentasyona sahip solgun ten ve cilt elastikiyeti kaybını içerir (101, 108).

Derinlemesine nüfuz eden UVA, dermisteki bağ dokusuna zarar verir ve ayrıca cilt kanseri riskini artırır, UVB ise yalnızca epidermise kadar nüfuz eder, burada güneş yanığı, bronzlaşma ve fotokarsinojeneze neden olabilir (96). UVB'nin küçük penetrasyon kabiliyeti cilt yaşlanması için bir avantaj olmasına rağmen, ışığa duyarlılaştırıcılar aracılığıyla hareket etmemesi, hücre ve DNA'ya doğrudan zarar vermesi gibi büyük bir dezavantaja sahiptir (114). UVB, doğrudan DNA hasarının başlıca nedeni ve indükleyicisidir. UVA, cildin foto yaşlanmasında daha büyük bir role sahiptir ve enflamasyon ile immünosupresyona neden olur (102). Dış yaşlanmanın ilk belirtileri (maruz kalan bölgelerde) erken yaşta görülebilir. Fotoyaşlanmaya uğrayan cilt, derin kırışıklıklar, gevşeklik, pürüzlülük, solgun veya sarı renk, artan kırılganlık, purpura oluşumu, benekli pigment değişiklikleri, bozulmuş yara iyileşmesi ve iyi huylu ve kötü huylu büyüme ile karakterizedir. Birikmiş güneşe maruz kalma derecesi bu değişikliklerin büyüklüğünü belirler (115).

Kolajen vücutta en yüksek miktarda bulunan proteindir. Dermisin temel yapısal bileşeni olarak insan derisine güç ve destek verir. Kolajendeki değişiklikler cildin yaşlanma sürecinde ayrılmaz bir rol oynar (116). Dermal kolajen demetleri genç erişkinlerde iyi organize edilmiştir ve burada iç içe geçmiş elastik lifler aracılığıyla düzenlenirler. Bununla birlikte, yaşlanan ciltte kollajen demetlerinin yoğunluğunda bir artış vardır, ancak bunlar parçalanmış, düzensiz ve daha az çözünür hale gelmek yerine uzayarak konfigürasyonlarını kaybederler. Kollajen indirgeyici enzimler (örneğin, matris metalloproteinazlar (MMP'ler)) hem foto yaşlanma hem de içsel yaşlanma sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROS)

üretimiyle birlikte yukarı doğru düzenlenir (117). Kollajen sentezi azalır, bu da sentez ve bozunma arasındaki dengede bir kaymaya neden olur. Spesifik olarak, genç ciltte kolajen I, dermal kolajenin %80'ini ve tip III, %15'ini oluşturur. Bununla birlikte, yaşla birlikte kolajen I'de bir azalma ve bunun sonucunda tip III'ün tip I kolajene oranında bir artış olur. Kollajen IV ve VII seviyelerinde de değişiklikler vardır. Dermo-epidermal bağlantının ayrılmaz bir parçası olan kolajen IV, diğer moleküller için yapısal bir çerçeve sağlar ve mekanik stabilitenin korunmasında önemli bir rol oynar. Kırışıklıklarda daha düşük seviyelerde kolajen IV ve kolajen VII bulunur, bu durum düşük kolajen seviyelerinin kırışıklık oluşumuna etkisi olduğunu düşündürmektedir (115).

İnsan derisi, elastik lifler açısından oldukça zengindir. Elastin yaşa bağlı çok sayıda değişiklik sergiler ve UV, çoğunlukla MMP'ler tarafından düzenlenen elastik liflerin yeniden şekillenmesini, bozunmasını ve fotoyaşlanmaya uğrayan derinin üst dermisinde elastinin anormal lokalizasyonunu tetikler (118). Fotoyaşlanmaya uğrayan ciltte üst dermiste yer alan bozulmuş elastik lifler, düzensiz tropoelastin ve fibrilinden oluşan karışık bir kütleyi temsil eder (119). Çoğu elastin lifi, 70 yaşın üzerinde anormal görünür. Bu anormal malzeme cilde esneklik kazandırmaz. Genç ciltte mekanik depresyondan kurtulma sadece dakikalar alırken, yaşlılarda bu süre >24 saate kadar uzayabilmektedir (120). UV ışınımı, hücre dışı matris malzemeleri elastin ve kollajeni bozan MMP'lerin ekspresyonunu indükler. Yapılan çalışmalar, UVA maruziyetinin, lizozim enziminin salınımına katkıda bulunduğunu ve bunun da hasarlı elastin liflerinin birikmesine neden olduğunu göstermiştir (121).

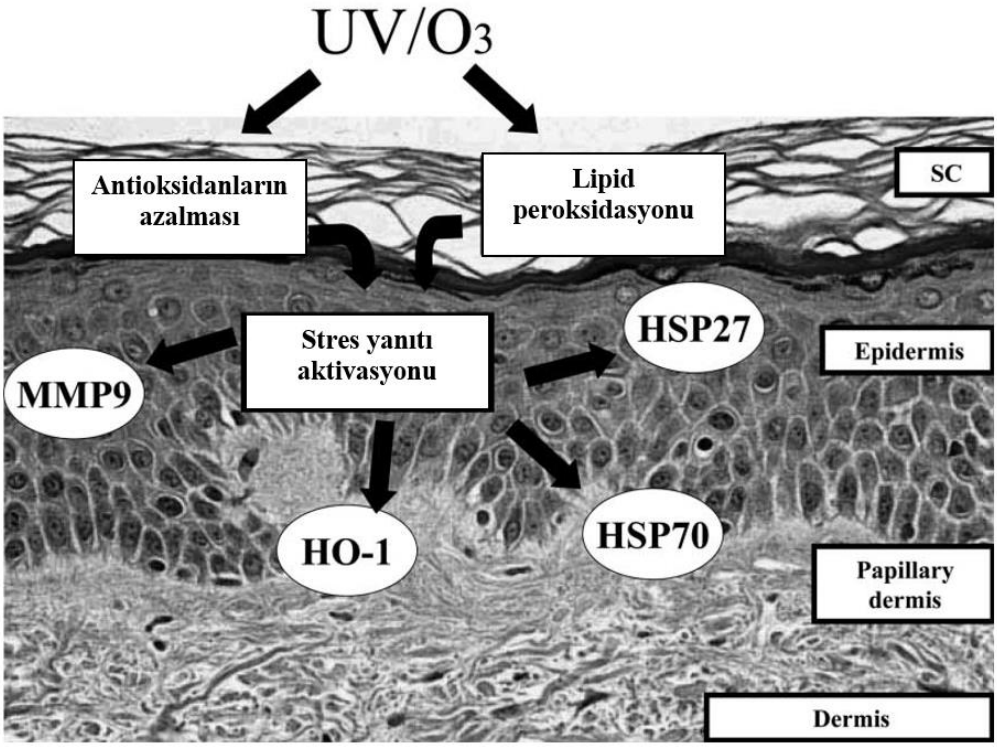
2.3.1. Oksidatif Stres

Hücresel ve moleküler biyolojik mekanizmaları açısından yaşlanmaya sebep olan pek çok faktör bulunmaktadır. UV ışınları, sigara kullanımı, hava kirliliği ve normal endojen metabolik süreçler yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) veya serbest radikallerin üretiminin ciltte yaşlanma sürecine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Serbest radikallerin yaşlanma üzerindeki etkisi ilk kez 1956 yılında ortaya atılan bir teori ile kabul edilmiştir. Serbest radikaller aynı zamanda oksijen türevleridir ve elektron kazanmak için diğer moleküllerle

birleşerek oluşurlar. Elektron sayısı çift olan moleküller kararlı iken, elektronlar reaktif olduğu için dokulara zarar veren tek sayılar ise reaktiftir (122).

ROS, gen ekspresyon yolaklarını indükler, kollajen yıkımının artması ve elastin birikimi ile sonuçlanır. ROS, sadece interstisyel kollajeni doğrudan yok etmekle kalmaz, aynı zamanda matris-metaloproteazların doku inhibitörlerini inaktive eder ve matrisi parçalayan metaloproteazların sentezini ve aktivasyonunu indükler (123).

UV ışınları, özellikle cilt yaşlanmasındaki ana faktörlerden biri olan ROS'un oluşumuna yol açar. ROS üretimi esas olarak 320–400 nm aralığında UVA tarafından yönlendirilir. Cilde nüfuz eden UVA ışınları, hücresel kromoforlar tarafından emilir. Bu hücresel kromoforlar, ürokanik asit, riboflavinler, melanin, bilirubin, porfirin gibi bileşenleri içerir, ancak DNA'yı içermez (114, 124). Ligandların olmadığı genel koşullar altında, hücre yüzeyi üzerindeki reseptör tirozin kinazların (RTK'ler) aktivitesi, RTK'leri fosforile eden reseptör protein tirozin fosfatazlar (RPTP'ler) tarafından inhibe edilir. Bununla birlikte, UV radyasyonu altında, hücresel kromoforlar enerjiyi emer ve uyarılır, oksidasyon ürünleri ve ROS üretir. ROS, RPTP'lerin katalitik bölgelerinde sisteine bağlanır, fosforile edilmiş RTK'lerin seviyesini yükseltir ve mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK) aktivasyonu ve ardından nükleer faktör-kB (NF-kB) ve transkripsiyon faktörü aktivatör proteini-1 (AP-1) dahil olmak üzere aşağı akış sinyal yollarını tetikler. Bu şekilde ROS, RPTP'lerin aktivitesini inhibe eder (125). Aktive edilmiş NF-kB ve AP-1, kolajen üretimini baskılar ve MMP gen transkripsiyonunu arttırır, bu da fotoyaşlanmış ciltte kolajen içeriğinin azalmasına neden olur (Şekil 2-3) (126).



Şekil 2-3: UV ışınları ve oksidatif stresin deriye etkisi (127)

Hücredeki enzimatik ve enzimatik olmayan ROS kaynakları çok çeşitlidir. Direkt olarak veya yan ürün olarak ROS üreten enzimler arasında mitokondriyal elektron taşıma zinciri, NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) oksidazlar, ksantin oksidoredüktaz (XOR), birkaç peroksizomal oksidaz, sitokrom P450 ailesinin enzimleri, siklooksijenazlar ve lipoksijenazlar bulunur. Elektron taşıma zinciri, iç mitokondriyal zarda bulunur. Elektronlar, NADH yoluyla kompleks I'e ve FADH2 (flavin adenin dinükleotidi) yoluyla kompleks II'ye beslenir, daha sonra kompleks III'e ve son olarak kompleks IV'e aktarılır. Kompleks IV'te (sitokrom c oksidaz) elektronlar sonunda moleküler oksijende biriktirilir ve bu da H_2O üretimi ile sonuçlanır. Bununla birlikte, elektronlar kompleks IV'e ulaşmadan önce kompleks I ve III'te erken O_2'ye sızarak su yerine süperoksit oluşumuna yol açabilir (122, 128, 129) . Tüketilen tüm oksijenin en az %1-2'sinin süperoksit oluşumuna yol açtığı tahmin edilmektedir (130).

Fotoyaşlanma sonucunda mitokondriyal DNA, tekrarlanan yapısal oksidatif stres nedeniyle düzenli DNA hasarına neden olur ve özellikle, güneşten

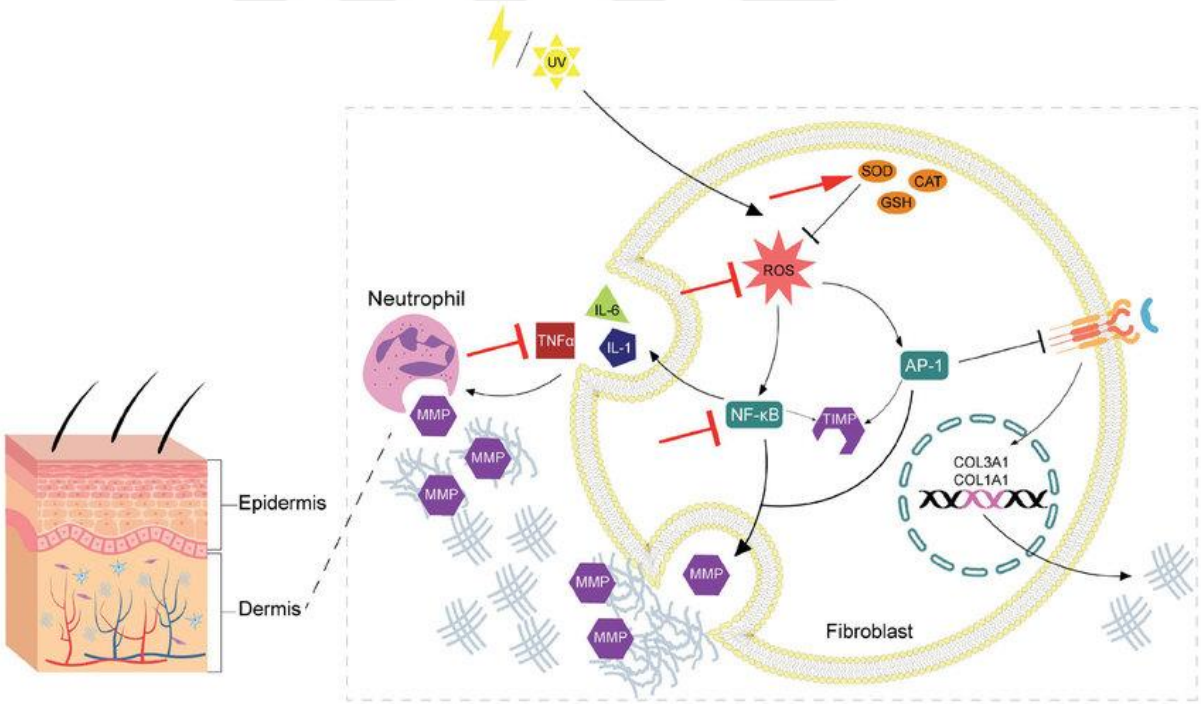
korunan cilde göre fotohasarlı ciltlerde 10 kat daha yaygın olan belirli bir DNA uzunluğunun silinmesi ile sonuçlanır. Silme işlemi, hücrenin enerji üretme kabiliyetine ek hasar vererek ROS'un daha fazla birikmesine neden olur. Foto-hasarlı ciltteki mitokondriyal DNA hasarının boyutu kronolojik yaşla değil, daha çok foto-hasar şiddetiyle ilişkilidir (131, 132).

Telomerler, kromozomların uçlarını bozunmadan ve anormal rekombinasyondan koruyan tekrarlayan nükleotid dizileridir. Her hücre bölünmesiyle kısalır ve sonuçta hücresel yaşlanmaya ve sınırlı sayıda hücre bölünmesine yol açar (133). Telomeraz, telomerlerin kısalmasını önlemek için telomer tekrarlarını sona ekleyen bir enzimdir. UV radyasyonu aşırı ROS üretimine yol açarak telomer mutasyonlarına ve daha fazla hücre ölümü veya yaşlanmasına neden olur (134). Normal somatik hücrelerde, DNA polimeraz, lineer DNA'nın 3' ucunu tam olarak kopyalayamadığından, DNA replikasyonu sırasında hücre bölünmesi başına 100 baz çiftinde telomeraz kısalır. İnsan fibroblastı bölündükçe telomerazın kısalması azalır ve bu da kırışıklık oluşumuna yol açar. Kısaltılmış telomeraz, p53 ve pRB yollarını başlatan DNA'ya zarar verir. UV ışınları telomer kısalmasını hızlandırır ve bu durum tümör baskılayıcı protein p53 gibi DNA hasarı yanıt proteinlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca, hücre tipine bağlı olarak proliferatif yaşlanmayı veya apoptozu indükler (135).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS), hem içsel yaşlanma hem de foto yaşlanmanın dermal hücre dışı matris değişikliklerinde kritik bir rol oynadığı kabul edilmektedir. ROS, mitokondriyal elektron taşıma zinciri, peroksizomal ve endoplazmik retikulum (ER) lokalize proteinleri, siklooksijenazlar, lipoksijenazlar, ksantin oksidazlar ve nikotinamid-adenin dinükleotit fosfat oksidazlar gibi enzimler dahil olmak üzere farklı kaynaklardan üretilebilir. ER'de ROS üretimine ana katkıda bulunanlar, sitokrom P450 ailesinin üyeleri ve protein disülfid izomeraz ile endoplazmik retikulum oksidoredüktin-1 (ERO1) kombinasyonudur. Protein disülfid izomeraz, katlama işlemi sırasında reseptör proteinlerinde disülfid bağlarının oluşumunu indükler. Bu süreçte izomeraz indirgenir ve oksidoredüktin ERO1 tarafından yeniden üretilir. İndirgenmiş protein ERO1 sonunda elektronu kofaktör FAD aracılığıyla moleküler oksijene aktarır. Eksik transfer süperoksit üretimine yol açabilir (115). Esas olarak ER'de bulunan sitokrom P450 ailesi, bu

maddelerin suda çözünürlüğünü artırarak, ksenobiyotiklerin veya lipofilik bileşiklerin detoksifikasyonundan sorumludur. Bu işlem için elektronlar, sitokrom P450 redüktaz yoluyla NADPH'den sitokrom P450'ye aktarılır ve sonunda ksenobiyotiklerin hidroksilasyonuna yol açar. Elektron transferi sırasındaki herhangi bir sızıntı oksijen radikallerinin, özellikle de süperoksitin oluşumuna neden olur (136). UV ışınlarına maruz kalan deride meydana gelen reaksiyonlar Şekil 2-4'te gösterilmiştir (115).

Deride ROS üretimini indükleme kapasitesine sahip çeşitli ksenobiyotikler ve kirletici etmenler arasında polisiklik aromatik hidrokarbonlar özel ilgi görmektedir. Bu düzlemsel aromatik bileşikler kömürde, yağda ve katranda bulunur ve özellikle yandıktan sonra tehlikelidir. Işıktan gelen enerjiyi absorbe ettikten sonra bu maddeler fotoaktif hale gelir ve sonraki işlemlerde ROS üretimi altında moleküler oksijen ile reaksiyona girer (115).



Şekil 2-4: UV ışımasına maruz kalan deride meydana gelen reaksiyonlar (137)

2.3.2. Deri Yaşlanmasını Önlemeye Yönelik Yaklaşımlar

Foto ve kronolojik yaşlanmanın dermal ve epidermal belirtilerini tersine çevirmeye yönelik cilt yaşlanması karşıtı stratejiler, cilt bakımı, topikal ajanların kullanımı, invaziv yöntemler, sistemik ajanlar, eksojen yaşlanma faktörlerinden kaçınma, yaşam tarzının ve alışkanlıkların düzeltilmesi olarak gruplandırılabilir. Kozmetik bakım, günlük cilt bakımını, kimyasal veya fiziksel geniş spektrumlu filtreli güneş kremleri kullanarak fotoyaşlanmayı önlemeyi ve popülasyonu fotoyaşlanma konusunda daha bilinçli davranış kazanmaları için bilinçlendirmeyi amaçlar. Topikal ajanlar, yaşlanmanın belirti ve semptomlarını önlemeye veya azaltmaya çalışmak için topikal antioksidanlar ve hücre düzenleyiciler gibi aktif maddeler içeren formülasyonların kullanımını kapsar. İnvaziv yöntemler, kimyasal peelingler, görünür ışık cihazları, yoğun darbeli ışık (IPL), lazerle foto-gençleştirme, radyofrekans (RF), enjekte edilebilir cilt biyostimülasyonu destekleyici ürünlerdir. Sistemik ajanlar ise antioksidanlardır (138, 139).

Sağlıklı ve işleyen cilt bariyeri dehidratasyona, çeşitli mikroorganizmaların penetrasyonuna, alerjenlere, tahriş edici maddelere, reaktif oksijen türlerine ve radyasyona karşı önemli bir koruyucudur. Cilt bariyeri, penetrasyona izin verecek şekilde özel olarak ayarlanabilir. Bu nedenle günlük cilt bakımı cildin yenilenmesini, elastikiyetini, pürüzsüzlüğünü artırabilir ve böylece cilt durumunu geçici olarak değiştirebilir (140). Ancak, cildin kollajen, elastin gibi birincil yapısal bileşenlerinin bozulmasını ve kırışıklıkların oluşumunu önlemek için cildin bozulmasını durdurmak gerekir. Bu bileşikleri cilde uygun şekilde vermek için gereken teknoloji henüz geliştirilmemiş olsa da, bazı ürünler bu maddelerin doğal sentezini destekler (97).

2.3.3. Fotokoruma ve Antioksidanlar

Cildi iyileştirmek için topikal veya sistemik antioksidanlar tarafından ROS etkilerinin azaltılması, kırışıklık oluşumunu engellemeye veya geciktirmeye yönelik bütünsel bir yaklaşımdır. Bu yaklaşım, reaktif oksijen türlerinin etkileriyle mücadele etmeyi temel alır (141).

İnsan derisi, hücreleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden korumak için bir dizi antioksidan enzimle donatılmıştır. Derideki antioksidan moleküller, onları

ortadan kaldırmak veya zararlı etkilerini en aza indirmek için ROS veya yan ürünleri ile etkileşime girer (138). Derideki antioksidanların dağılımı tek tip değildir, ancak daha derin katmanlarda daha yüksek konsantrasyonlarda ve cilt yüzeyine doğru azalan konsantrasyonlarda bir gradyan izler (3). Bu, SC katmanlarının fizyolojik dönüşümün bir parçası olarak zamanla yukarı doğru hareket etmesi ve yeni farklılaşmış keratinositlerin yerini almasıyla açıklanabilir. Bu nedenle, yüzeysel katman, daha derin bir katmandan daha uzun süre kronik oksidatif strese maruz kalır. Bu antioksidan moleküller arasında glutatyon (GSH), E vitamini, C vitamini, GSH peroksidazlar, GSH redüktaz, GSH S-transferazlar, superoksit dismütazlar, katalaz ve kinon redüktaz bulunmaktadır. Vitamin C ve GSH çözünür antioksidanlardır, vitamin E ise membrana bağlıdır ve serbest radikal aracılı zincir reaksiyonlarını durdurabilir (142).

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon biyosentezleyici enzimler gibi enzimler dokuları serbest radikallerden korur. Ek olarak, A, C ve E vitaminleri gibi antioksidan moleküller ya serbest radikallerin hassas biyolojik molekülleri oksitlemesini önleyerek ya da serbest radikallerin oluşumunu azaltarak ve halihazırda oluşmuş ROS'u bastırarak yaşlanma sürecini yavaşlatır. Bu antioksidanların yanı sıra antioksidan enzimlerin seviyeleri, yaş ve UV maruziyeti gibi çeşitli çevresel stres faktörleri ile azalır. ROS seviyeleri hızla arttığında, ciltte bulunan antioksidanlar bu ROS'ları etkili bir şekilde temizleyemezler. Bu antioksidanları yenilemek cildi yaşlanmaya karşı koruyabilecek bir yaklaşımdır (143).

Antioksidanlar, reaktif molekülleri inhibe ederek zararlı serbest radikalleri nötralize eder, böylece hücreleri endojen ve eksojen stres faktörlerinden korur, hücrelerin yaşamlarını ve canlılıklarını uzatır. İdeal koşullar altında cilt, kendisini serbest radikal hasarından korumak için bir dizi endojen enzimatik ve enzimatik olmayan oksidan kullanır. Enzimatik antioksidanlar arasında glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz yer alır; enzimatik olmayan antioksidanlar arasında C vitamini, glutatyon, E vitamini, koenzim Q10 (ubikinon-10) ve alfa lipoik asit bulunur. UV ışığına maruz kalmanın, kronolojik yaşlanma gibi doğal olarak oluşan bu antioksidanları tükettiği bilinmektedir. Yeterli antioksidan koruma olmadan,

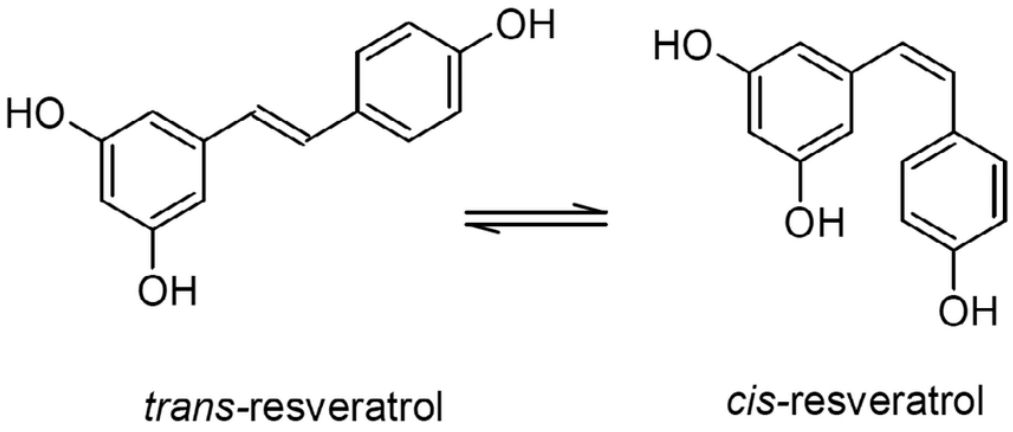
üretilen serbest radikaller kontrolsüz bırakılır ve bu da cildin yaşlanmasına neden olur (144).

Yapılan çalışmalarda, cildi ek antioksidanlarla takviye etmenin güneş kaynaklı hasarlara karşı dikkat çekici bir şekilde ek koruma sağladığı, cilt yaşlanmasını yavaşlattığı, iltihabı azalttığı ve nihayetinde cilt görünümünü iyileştirdiği gösterilmiştir (145). Kırışıklıklara karşı geliştirilen son nesil tedaviler, süperoksit dismutaz, Vitamin C, E, resveratrol, alfa lipoik asit gibi bileşenlerin antioksidan özelliklerine dayanır. Topikal uygulanan antioksidanlar, serbest radikal aracılı foto-karsinojenez ve foto-yaşlanma insidansını azaltma yetenekleri nedeniyle UV hasarlı ve yaşlanan cildi korumak ve iyileştirmek için geniş kapsamlı faydalara sahiptir (146).

Savunma mekanizmalarını güçlendirmek ve ciltteki antioksidan düzeylerini desteklemek için geçmişten günümüze dek çeşitli yaklaşımlar uygulanmıştır. Oral takviyeler, absorpsiyon, taşıma ve metabolizma dahil olmak üzere fizyolojik süreçlerden dolayı cilt antioksidan seviyelerini arttırmada yeterince başarılı olmamaktadır. Çalışmalar, antioksidanların cildin antioksidan rezervuarını doğrudan desteklemek için deri yoluyla verilebileceğini göstermiştir. Topikal ajanlar tek başına cilt yaşlanmasını önleme ve tedavi sağlar. Bununla birlikte, topikal bileşiklerin çok çeşitli mevcut kozmetik prosedürlerden bir veya birkaçıyla birleştirilmesi, yaşlanmayı geciktirici etkilerin en üst düzeye çıkarılmasına yardımcı olur (147).

2.3.3.1. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben), meyvelerde, özellikle üzüm, çilek gibi meyvelerin kabuklarında, ayrıca yer fıstığıve çayda bulunan kimyasal bir bileşiktir (148). Resveratrolün cis ve trans olmak üzere iki farklı izomerik formu doğada mevcuttur. Resveratrolün trans formu, konfigürasyonu nedeniyle östrojenik aktivite gösterir. Resveratrolün cis-formu kararsızdır ve UV ışığına maruz kaldığında trans-forma dönüşür (149). Trans-resveratrol ve cis-resveratrolün yapısı Şekil 2-5'te gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Trans-resveratrol ve cis-resveratrolün kimyasal yapıları (150)

Resveratrolün, özellikle patojen saldırısı, yaralanması veya UV maruziyeti sonucu bitkiler tarafından üretilen bir fitoaleksin olduğu bilinmektedir (151).

Resveratrol, bir antioksidan ve anti-mutajen olarak kanser oluşumuna yol açan hücre değişikliklerini bloke eder ve vücutta istenmeyen dokuların oluşmasını engeller. Polifenoller, flavonoid ve flavonoid olmayan olarak ikiye ayrılır. Flavonoidler, meyve ve sebzelerde bulunan en yaygın polifenollerdir. Flavonoid olmayan polifenoller ise stilbenler ve ligandlardan oluşmaktadır. Doğal bir stilben olan resveratrol, flavonoid olmayan biyolojik olarak en aktif fenoldür (152).

Vitamin E, glutatyon, koenzim Q10 ve alfa-lipoik asit günümüzde esansiyel antioksidanlar olarak bilinmelerine rağmen, son zamanlarda birçok yaşlanma karşıtı ürünün içeriğinde resveratrol maddesine yer verilmektedir. Üzüm kabuğundaki resveratrolün antioksidan özelliği, E vitaminden 50 kat ve C vitaminden 30 kat daha fazladır. Resveratrol, insan derisindeki bağlanma bölgelerine bağlanır ve keratinositlerdeki mitokondriyal disfonksiyonu ve apoptotik olayları bloke ederek normal cilt yaşlanma sürecini geciktirir (3).

İnsan keratinosit hücreleriyle yapılan çalışmalar, trans-resveratrolün hidrojen peroksit üretimini inhibe edebildiğini göstermiştir. Transresveratrolün insanlarda UVA radyasyonuna karşı koruyucu etkisinin yanı sıra yaşlanmanın klinik belirtilerini de iyileştirmektedir (153).

Resveratrol antiinflamatuar etkisi ile doku hasarını ve hücresel proliferasyonu engeller (154). In vitro çalışmalar, resveratrolün hem AP-1 (aktivatör protein I) hem de NFkB (Nükleer Faktör kappa B)'nin aşağı doğru regülasyonunda rol alıp ve böylece dermal kollajenin korunmasında ve cilt iltihabının azaltılmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (155).

Sirtuin 1 (SIRT1) ve nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2) yolları, resveratrolün biyolojik etkisi ile ilgili daha yaygın olarak incelenen yollardan ikisidir ve yaşlanmayı geciktirme potansiyeli ile bağlantılı olmaya devam etmektedir. Resveratrolün, sirtuin adı verilen önemli bir enzim grubunu aktive ederek sağlık ve uzun ömür üzerinde yararlı etkiler gösterdiği bilinmektedir (156). 2013'te yapılan bir çalışma, resveratrolün spesifik bir sirtuin geni olan SIRT1'in aktivitesini arttırdığını göstermiştir (157). Sirtuinler ilk olarak mayalarda keşfedilmiş ve son zamanlarda memelilerde tanımlanmıştır. En önemlisi SIRT1 olmak üzere yedi memeli sirtuin vardır. SIRT1, stres zamanlarında hayatta kalmak için gerekli olan belirli transkripsiyon faktörlerini açıp kapatan nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) bağlı bir deasetilazdır. Resveratrol, peroksizom proliferatör aktivatör gama koaktivatör 1 alfa'yı (PGC-1α) deasetile eden ve aktivitesinde bir artışa neden olan SIRT1'i aktive ederek çalışır (156). PGC-1α, glukoneogenezi ve lipid metabolizmasını düzenleyen genlerin transkripsiyonunu indükler. SIRT1 mitokondri hızını arttırmakta ve vücudu hastalıklardan korumakta görev almaktadır. SIRT1 ve PGC-1α aracılığıyla resveratrol, mitokondriyal fonksiyonu artırır ve enerji homeostazı üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir (158).

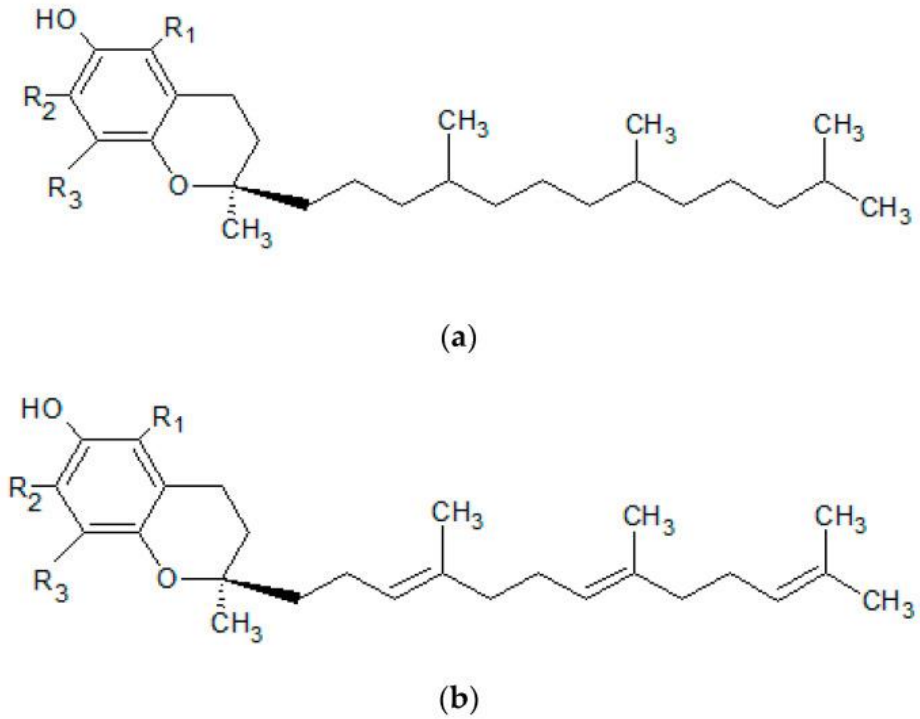
Resveratrolün stilben kimyasal yapısı, sentetik bir östrojen olan dietilstilbesterolünkine benzemektedir. Resveratrol bir fitoöstrojen ve östrojen beta reseptör agonisti (ERβ)'dir (159). Menopoz sonrası kadınların yılda %1 oranında kolajen kaybettiği ve cildin ince, kırışık ve kırılgan hale geldiği bilinmektedir (160). Östrojen replasman tedavisi kolajen kaybını azaltır ve cilt yaşlanmasının klinik belirtilerini iyileştirir. Resveratrol gibi fitoöstrojenlerin kullanımı, ilişkili riskler olmaksızın cilt yaşlanmasını önlemede faydalıdır (161, 162).

Resveratrolün emilim oranı yüksek olmasına rağmen biyoyararlanımı çok düşüktür (163). Yapılan bir çalışmada, 25 mg resveratrolün oral dozu %70 absorpsiyon ile sonuçlanmasına karşın, resveratrol ve metabolitlerinin (glukuronid

ve sülfat konjugatı) plazma konsantrasyonu sadece 2 μM olarak bulunmuştur. (164).

2.3.3.2. Vitamin E

Vitamin E, antioksidan özelliklere sahip yağda çözünen vitaminler olan toplam sekiz farklı tokoferol ve tokotrienol kümesinin toplu adıdır. Vitamin E, dört tokoferol (α-, β-, γ- ve δ-tokoferol) ve dört tokotrienol (α-, β-, γ- ve δ-tokotrienol) içeren bir lipofilik bileşik grubudur (165). E vitamini olarak adlandırılan tüm bileşiklerin kimyasal yapıları, iki halkalı 6-hidroksikroman iskeletine ve üç izoprenoid birimden oluşan bir yan zincire sahiptir. Tokoferoller, bir izopren molekülünün bir kromanol halkası ve bir hidrofobik yan zincirini içeren kimyasal bileşiklerdir ve kromanol halkasındaki metil grubunun farklı ikame edilmiş konumuna ve hidrofobik yan zincirin doymamışlığına bağlı olarak sekiz farklı biçimde bulunurlar (Şekil 2-6) (166).



Şekil 2-6: (a) tokoferollerin ve (b) tokotrienollerin temel yapısı (166)

Tokoferollerin antioksidatif mekanizması kısmen kromanol halkasındaki hidroksil grubunun serbest radikalleri azaltmak için bir hidrojen atomu bağışlamasına bağlıdır (167).

Epidermal E vitamininin en olası fizyolojik işlevi, cildin antioksidan savunmasına katkıda bulunmak, epidermisi ve dermisi çevresel faktörlerin neden olduğu oksidatif strese karşı korumaktır. Vitamin E, insan vücudunda bulunan başlıca yağda çözünen antioksidandır (165). E vitamini antioksidan özellikleri ve serbest radikalleri temizleme ve lipit yapılarının bir parçası olma yeteneği sayesinde, lipit peroksidasyonuna karşı koruma sağlar ve cilt yaşlanmasını yavaşlatır (168). Alfa-tokoferolün reaktif oksijen türleri tarafından dolaylı olarak üretilen 8-hidroksideoksiguanozin miktarını azalttığı gösterilmiştir, bu nedenle ROS'un neden olduğu DNA hasarını azaltabilir ve böylece cilt kanseri gelişimini geciktirmeye yardımcı olabilir (169).

Fizyolojik koşullar altında, a-tokoferol GSH'yi uyarır. Tokoferol, çeşitli oksidatif stres koşullarını önleyici etkiye sahiptir. Bir tümör destekleyicisi olan 12-O-tetradecanoylphorbol-13-asetat, oksidatif stresi indükler (170). Yapılan bir çalışmada, 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat maruziyetinden 30 dakika önce cilde tokoferol uygulanmasının, H_2O_2 indüksiyonunu, miyeloperoksidaz aktivitesini, ksantin oksidaz aktivitesini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (171).

Alfa-tokoferol asetat, UVB'nin neden olduğu ödem, eritem ve lipid peroksidasyonunu baskılar. UVA, mRNA'nın ekspresyonunu ve interlökin 8 (IL-8) proteininin salgılanmasını önemli ölçüde düzenler ve AP-1 DNA bağlama aktivitesini arttırır. UVA'nın bu etkileri, doza bağlı bir şekilde a-tokoferol tarafından etkili bir şekilde azaltılabilmektedir (172).

Alfa -tokoferolün, AP-1 DNA bağlanması üzerindeki baskılayıcı etkileri yoluyla MMP-1'i aşağı doğru regüle eder. Yaşlı donörlerden izole edilen dermal fibroblastlar, genç donörlerden daha yüksek seviyelerde MMP-1 üretir. Alfa-tokoferol, protein kinaz C aktivitesinin inhibisyonu yoluyla metalloproteinaz doku inhibitörü olan doğal inhibitörünün seviyesini değiştirmeden, yaşlanan fibroblastlarda artan kollajenaz gen transkripsiyonunu hafifletir (169, 172).

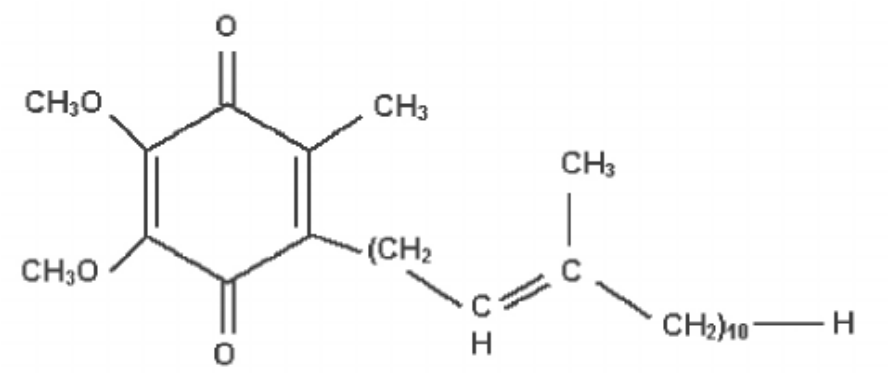
Alfa-tokoferol takviyesinin yüz hiperpigmentasyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir. Ichihashi ve arkadaşları, kültürlenmiş insan melanom hücrelerini ve normal insan melanositlerini kullanan bir in vitro çalışmada, alfa-tokoferolün tirozin hidroksilaz aktivitesini inhibe ettiğini ve melanogenezi baskıladığını göstermiştir. Bu nedenle, E vitamini, yaşa bağlı durumlar veya güneşe maruz kalmaktan kaynaklananlar dahil olmak üzere hiperpigmentasyonun tedavisi için aday bir beyazlatma maddesi olabilir (173).

Bazı araştırmalar ayrıca E vitamininin güçlü fotokoruyucu, sıkılaştırıcı, nemlendirici ve yaşlanma karşıtı özellikler gösterdiğini ve ayrıca epidermisin ve dermisin elastikiyetini, yapısını ve yumuşaklığını geliştirdiğini göstermektedir. Hücreler arası çimento ve lipid yapılarına dahil olan E vitamininin cildi güneşin UVB ışınlarına karşı koruduğu düşünülmektedir (174, 175).

E vitamini, etiyolojisi değişen yaraların iyileşmesinde rol oynar; subkorneal püstüler dermatozlar, kutanöz amiloidoz, atopik dermatit, epidermolizis bülloza, sedef hastalığı, akne vulgaris ve skleroderma gibi dermatolojik durumların tedavisinde; cilt kanseri önlemede etkili olduğu kanıtlanmıştır (175, 176).

2.3.3.3. Koenzim Q10

Koenzim Q10 (2,3-dimetoksi-5-metil-6-dekaprenil-1,4-benzokinon), vitamin Q olarak da adlandırılan, vitamin benzeri, yağda çözünen bir moleküldür. Kimyasal yapısı poliizoprenoid yan zincirine sahip bir p-benzokinon halkasından oluşur (Şekil 2-7). Koenzim Q10, vitamin A,C, ve E ile birlikte vücudun her hücresinde bulunur, güçlü antioksidan etki ve kolajen arttırımı sağlar (177). Koenzim Q10**,** mitokondriyal solunum zincirinin ayrılmaz bir parçası olduğundan, koenzim Q10 uygulamasının mitokondriyal fonksiyon üzerinde güçlendirici etkisi bulunur. Koenzim Q10 genellikle mitokondrinin oksidatif fosforilasyon sürecinde bir elektron taşıyıcısı olarak önemli bir rol oynarken, mitokondri dışında bir antioksidan görevi görür (178). Ayrıca ATP formunda enerji üreterek aerobik hücresel solunuma katılır. CoQ10, hücreleri serbest radikallerin neden olduğu yaşlanmaya karşı koruyan, cilt bakım ürünlerinde sıklıkla kullanılan bir antioksidandır. CoQ10'un ayrıca, manganez süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerini artırarak ultraviyole B ışığının ciltte neden olduğu oksidatif stresi güçlü bir şekilde inhibe eder (179, 180).



Şekil 2-7: Koenzim Q10 kimyasal yapısı (181)

Koenzim Q10, membran fosfolipid peroksidasyonuna karşı koruma sağlayan plazma ve diğer hücre içi membranların stabilize edilmesinde önemli bir rol oynayan, antioksidan olarak sıklıkla kullanılan doğal bileşiklerden biridir (182). Yaşlanma sırasında, deri de dahil olmak üzere organlardaki koenzim Q10 seviyeleri azalır ve bunun sonucunda vücutta 0,50 ile 1,65 µg/mL arasındaki normal seviyelere ulaşmak için ek koenzim Q10 sağlanması gerekir. Yapılan çalışmalarda, koenzim Q10'un topikal uygulamasının UV ışınlarına maruz kalmış ciltteki kırışıklıkları azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (180, 183).

Koenzim Q10, 863,36 g/mol'lük büyük bir moleküler ağırlıkla suda düşük çözünürlük (0,193 µg/mL) gösterir. Bu durum deriye penetrasyonunu sınırlar ve boynuzsu tabakada birikme eğilimi göstermesine neden olur. Ayrıca, koenzim Q10 ışığa maruz kaldığında bozunmaya uğrar (184).

Deride, epidermisteki koenzim Q10 seviyesi dermise göre 10 kat daha yüksektir (185). Cildin en dış tabakası olan epidermis, UV ışınlarına ve diğer çevresel faktörlere doğrudan maruz kalır ve UV ışınlarının derideki koenzim Q10 gibi antioksidanları tükettiği bilinmektedir. Bu nedenle epidermise topikal olarak koenzim Q10 uygulanması cilt yaşlanmasını önlemek için faydalı bir yaklaşımdır (180).

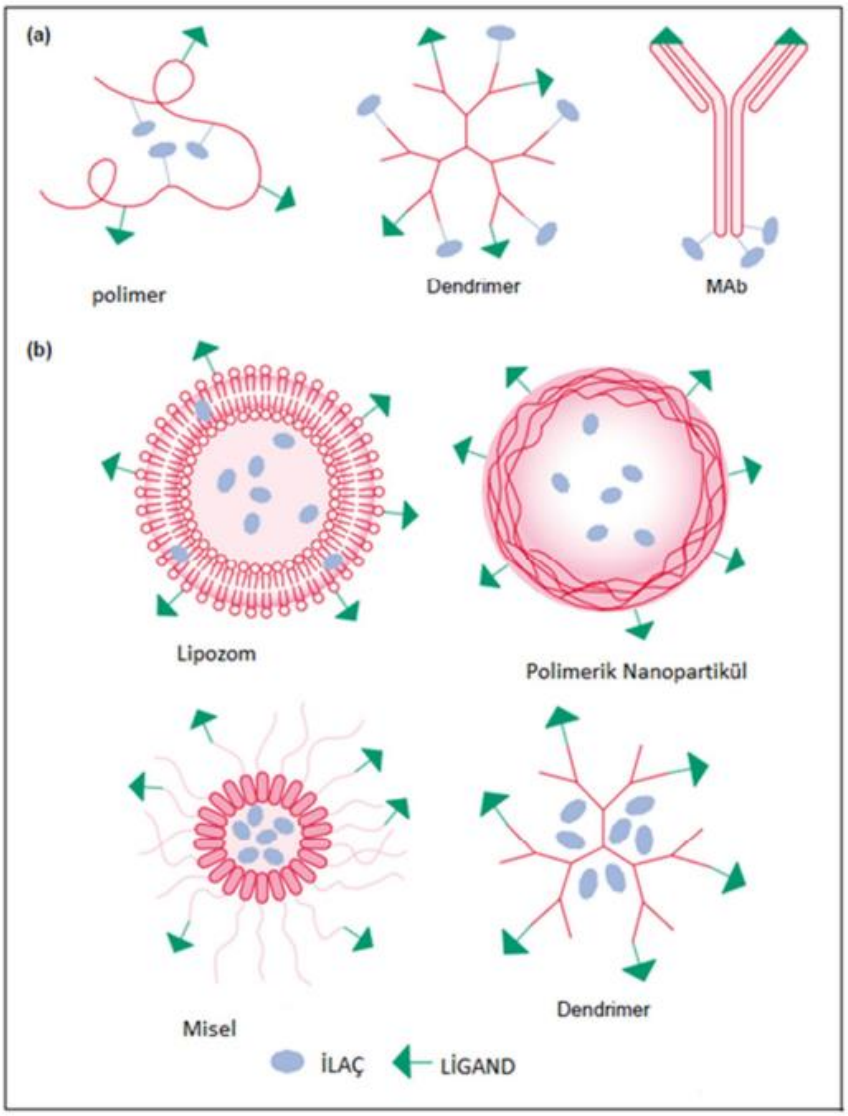
Hoppe ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, 6 ay boyunca insan derisine topikal olarak uygulanan CoQ10'un kırışıklıkların derinliğini azalttığı sonucuna ulaşılmıştır. Koenzim Q10'un topikal olarak uygulanması aynı zamanda

mitokondriyal fonksiyonları geliştirerek hücresel düzeyde yaşlanmayı geciktirmiştir (185).

Muta-Takada ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, koenzim Q10'un bazal membran bileşenlerinin üretimini arttırdığı, fibroblast proliferasyonunu arttırdığı ve hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiş ve böylece koenzim Q10'un cilt üzerindeki yaşlanma karşıtı etkileri kanıtlanmıştır (186).

2.4. İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bir ilacın etki göstermesi için öncelikle etki edeceği bölgeye taşınması gerekmektedir. Bu yüzden ilaç taşıyıcı sistemler her zaman ilgi çekici bir alan olarak araştırılmıştır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte birçok yeni ilaç ve ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. İlaç etken maddelerinin kısa yarıömür, çabuk bozunma, yüksek toksisite, düşük çözünürlük, yüksek doz, spesifik olmayan taşınma gibi kısıtlılıkları bulunabilmektedir. İlaçların sahip olduğu bu dezavantajların en aza indirgenmesi için yeni ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmesi üzerine çalışılmaktadır. Yeni ilaç taşıyıcı sistemler, ilaçların etki edeceği bölgeye hedeflendirme ile daha pratik ve daha etkili şekilde taşınmasını sağlamak için geliştirilmiştir. Nanoteknolojideki gelişmeler ile nanotaşıyıcılar ve lipozomlar aracılığıyla ilaçların taşınması öne çıkmaktadır Bu yaklaşım ile lipozom veya nanokapsüller, nanopartiküller, dendrimerler, miseller gibi nanotaşıyıcılar ilaç taşıyıcı sistem olarak formülasyonda yer alır. Nano ilaç taşıyıcı sistemler, ilacın çabuk parçalanmasını önlemek, az dozla daha fazla veya uzun süreli etki sağlamak ve hedeflendirme gibi faydalarından dolayı formülasyonlarda yer almaktadır. Lipozomlar, nanopartiküler sistemler, polimerik miseller, etkin madde polimer konjugatları bu sistemlere örnektir (Şekil 2-8) (187, 188, 189).



Şekil 2-8: İlaç taşıyıcı sistemler (190)

a)Makromoleküler konjugatlar b)Partiküler ilaç taşıyıcıları

2.4.1. Lipozomlar

Lipozomlar, kolesterol ve toksik olmayan doğal fosfolipidlerden oluşturulabilen küresel şekilli küçük yapay keseciklerdir. Boyutları nanometre ile birkaç mikrometre arası değişebilen veziküler sistemlerdir. Fofolipid çift katmandan oluşurlar. Boyutları ve hidrofobik ve hidrofilik karakterleri nedeniyle (biyouyumluluğun yanı sıra), lipozomlar sıklıkla tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Lipozomlar, teşhis, tedavi gibi uygulamalarda kullanılan çok yönlü

yapılardır. Yapıları hücrelere benzer ve bu nedenle, membran lipidleri ile biyomoleküllerin, iyonların ve ilaçların geçirgenliği arasındaki etkileşimleri incelemek ve antibiyotiklerin etki mekanizmasını aydınlatmak için hedef organizmalar üzerinde daha doğal bir yöntem olarak kullanılabilmektedirler. Lipozomlar sayesinde ilaçların kısa yarı ömür, zayıf çözünürlük, çabuk bozunma gibi kısıtlamalarının üstesinden gelinebilmektedir (191).

1964 yılında ilk kez Bangham ve ark. sulu ortamdaki fosfolipitlerin kapalı çift katmanlı bir yapı oluşturduğunu gözlemişlerdir (192). 1968 yılında Weissmann ve ark. bu küreleri "lipozomlar" olarak adlandırmışlardır. Lipozomlar, topikal ve farmasötik uygulamalarda makromolekülleri ve aktif bileşenleri hedeflenen bölgelere taşımak için kullanılır. Hidrofilik maddeleri kolayca kapsülleyebilen içi boş küresel şekle sahip lipit çift katmanlı yapılardır (Şekil 2-9) (193).

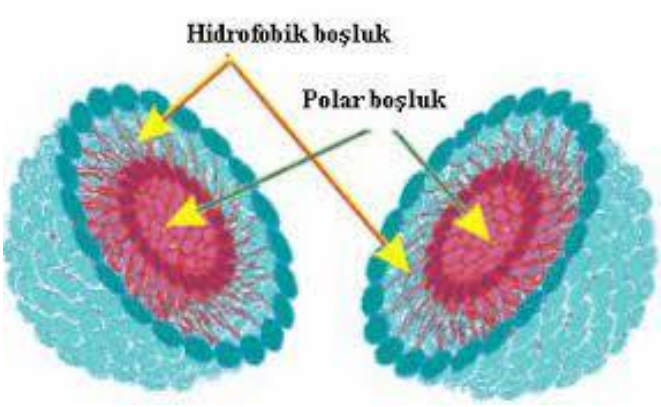
Lipozomlar, biyolojik membranlar ve çeşitli hücreler ile etkileşimler dahil olmak üzere birkaç spesifik biyolojik özellik sergiler. Tamamen doğal malzemelerden yapılabilirler ve bu nedenle toksik değildirler, biyolojik olarak parçalanabilirler ve immünojenik değildirler. Lipozomlar topoloji, membran biyofiziği, fotofizik ve fotokimyasal bilimler, kolloidal etkileşimler, hücre fonksiyonu, sinyal iletimi ve diğer birçok alanda faydalı modeller sunar (194).

Lipozomların birçok farmakolojik ve tıbbi uygulaması araştırılmıştır (195). İlaçlar veya çeşitli belirteçler içeren lipozomların terapötik ve tanısal uygulamaları, belirli maddelerin etki mekanizmasını araştırmak için model araç veya reaktif olarak kullanımları mevcuttur. Lipozomlar ile terapötik aralığı dar etken maddelerin etkinliğinin ve biyoyararlanımlarıın arttırılması mümkündür (196).

Lipozomlar, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde çok sayıda molekül için taşıyıcı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Lipozomlar hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşikleri yakalayabilir, kapsüllenen kombinasyonların ayrışmasını önleyebilir ve aktif bileşenleri belirlenen hedeflerde serbest bırakabilir (197).

Biyouyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilir olmaları, düşük toksisiteleri ve hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçları yakalama ve tümör dokularına bölgeye özgü ilaç taşıyabilme yetenekleri nedeniyle, lipozomlar hem

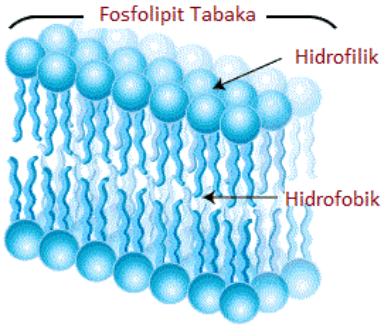
araştırmalarda hem de ticari olarak sıklıkla tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir (198).



Şekil 2-9: Lipozomların üç boyutlu yapısı (199)

2.4.1.1. Lipozomların Yapısı

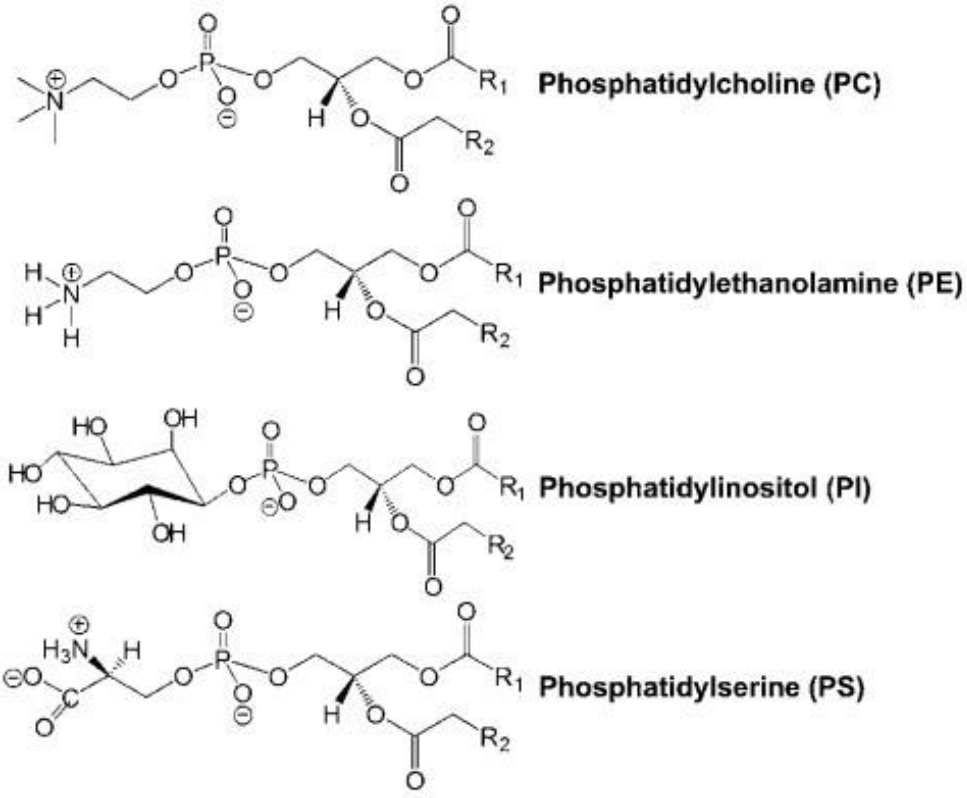
Lipozomlar, yapısında fosfolipit bulunan amfifilik vezüküllerdir. Lipitler, hayvanlarda ve bitkilerde ve tüm hücre tiplerinde bulunan doğal olarak oluşan bileşiklerdir. Diğer biyomolekül gruplarından belirgin şekilde farklıdırlar, suda çözünmezler, ancak kloroform gibi organik çözücülerde yüksek oranda çözünürler. Uzun zincirli hidrokarbon grupları, zincir hidrokarbon grupları da içerebilir. Esas olarak karbon ve hidrojenden oluşsalar da, lipid molekülleri ayrıca oksijen, azot, kükürt ve fosfor da içerebilir (200). Lipitler biyolojik olarak yakıt molekülleri, yüksek konsantrasyonlu enerji depoları, sinyal molekülleri ve membran bileşenleri olarak işlev görür. Lipitler apolar yapıya sahiplerdir. Fosfolipitler ise yapılarında fosfat grubundan dolayı polar yapıya sahiptirler ve suyla karışabilirler. Fosfolipitler suyla karşılaştığında hidrofobik kısımları sudan uzaklaşıp hidrofilik kısımları suya doğru olacak şekilde düzenlenirler. Membran lipidlerinin üç ana tipi, fosfolipidler, glikolipidler ve kolesteroldür (201). Fosfolipidler fosfat grubu içeren bir grup lipidlerdir (Şekil 2-10). Fosfolipitler, lipozomların ve hücre zarlarının yapı taşlarıdır. Vücudumuzun diğer kısımları gibi cildimiz de hücrelerin birleşiminden oluşur ve cildi oluşturan hücre zarının istenilen şekilde çalışabilmesi için sağlıklı ve dayanıklı olması gerekir (202).



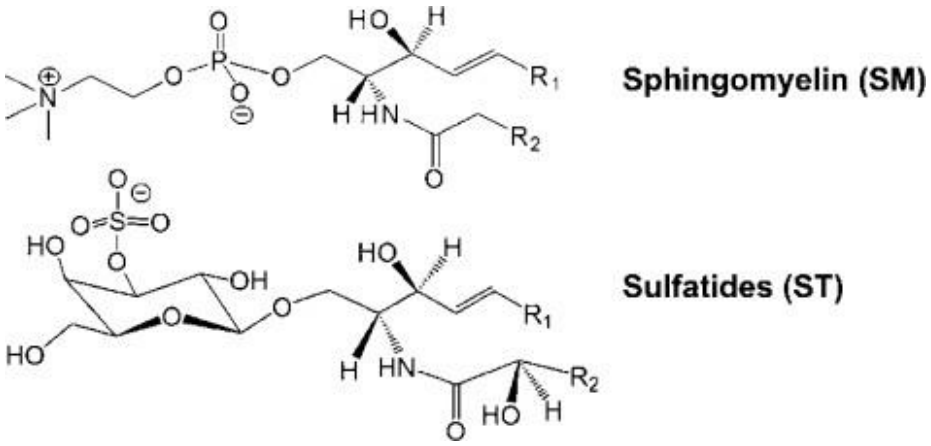
Şekil 2-10: Fosfolipit yapısı (203)

Esas olarak iki fosfolipid sınıfı bulunmaktadır: gliserofosfolipidler ve sfingoposfolipitler. Gliserofosfolipidlerin yapısında gliserole bağlı iki yağ asidi fosfodiesteri vardır. Fosfat'a bağlanan baş grup kısmı, azotlu bazlar, amino alkoller veya polioller içerir. Gliserofosfolipidler, çeşitli fosfolipid türlerinin bir karışımı olarak doğal kaynaklardan elde edilir. Genel olarak, bu gliserofosfolipid karışımı, endüstriyel olarak bir emülgatör olarak kullanılan lesitin olarak adlandırılır (204).

Sfingosfosfolipid, sfingosin yapısının yanı sıra fosfor içerir. Bu sınıfta en yaygın olanı sfingomiyelin 5 adı verilen N-açilşingozin fosforilkolin esteridir. En yaygın kullanılan fosfolipid türü fosfatidilkolindir. Lipozomların hazırlanmasında esas olarak doğal, yarı sentetik ve sentetik fosfolipidler kullanılır. En yaygın olarak kullanılan fosfolipidler Şekil 2-11 ve Şekil 2-12'de gösterildiği gibi yumurta veya soya fosfatidilkolini (PC), dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC), distearilfosfatidilkolin (DSPC), fosfatidilinositol (PI), sfingomyelin (SM), fosfatidilositol (PS) ve fosfatidilserin (PE)'dir (203).

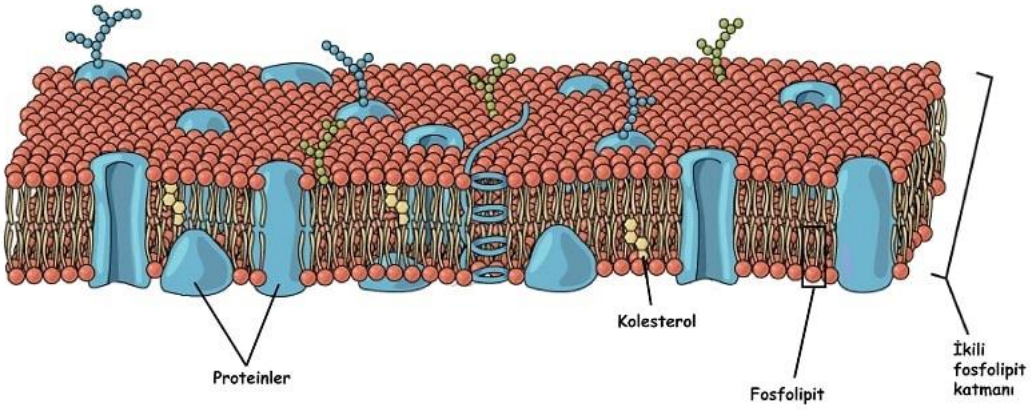


Şekil 2-11: Gliserofosfolipidler (205)



Şekil 2-12: Sfingolipidler (205)

Fosfolipidler doğal olarak hücre zarlarında çift katmanlar halinde bulunur (Şekil 2-13). Fosfolipidler ağırlıklı olarak memeli hücrelerinin plazma zarında bulunur. Fosfolipitler hücre zarlarına benzer. Hem suda hem de yağda çözünen aktif maddeleri kapsülleyebilirler. Hücre zarı ile etkileşir ve olağan şekilde cilt yapısına giremeyen bileşiklerin penetrasyonunu kolaylaştırır (206).



Şekil 2-13: Hücre zarının yapısı (207)

Lipozomlar, farklı polarite ve büyüklükteki materyalleri kapsülleme kapasitesine sahiptir. Kapsülleme kapasitesi, yapılarında fosfolipid çift katmanlarının varlığı ile arttırılır (208). Bunun yanında konvansiyonel lipozomların kullanımının çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. Bu sınırlamalar, konvansiyonel lipozomların, terapötik maddelerin yavaş salınımına ve gelişmiş biyoyararlanımına izin vermek için dolaşımda daha uzun süre kalamamasıdır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek adına yapılan çalışmalarda, çift tabaka yapısında soya fasulyesi ve yumurta sarısı gibi doğal kaynaklardan elde edilen fosfolipidlerin seçiminin lipozom özelliklerini etkilediği sonucuna varılmıştır. Lipozom formülasyonunda lipid olarak soya lesitini kulanımı, yumurta sarısı lesitinden çok daha fazla geçirgen olan lipozomların büyük ölçekli üretimini kolaylaştırmıştır (202, 209).

Lesitin genellikle çeşitli trigliseritleri, fosfolipidleri (fosfatidilinositol, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin) ve glikolipidleri ifade eder. Bununla birlikte,

biyokimyasal açıdan lesitin terimi, özellikle ayçiçeği, soya fasulyesi, pirinç gibi bitkilerden ekstrakte edilen fosfat fraksiyonundan türetilen bir fosfolipid olan saf fosfatidilkolin anlamına gelir (210). Doğal fosfolipidler yumurta sarısı, deniz kaynakları ve süt gibi hayvansal kaynaklardan da elde edilebilir. Lipozomal formülasyon için, soya fasulyesi dışındaki kaynaklardan elde edilen lesitin bazı dezavantajlar taşır. Örneğin, sığır veya yumurtadan elde edilen lipitler, yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle stabilite sorunlarına sahiptir. Bu nedenle, bu kaynaklardan elde edilen lesitin, daha az çoklu doymamış yağ asidi içeren soya fasulyesi lesitini ve diğer bitki türevli lesitin ile karşılaştırıldığında daha az stabildir. Ek olarak, sığır ve yumurtadan elde edilen lesitin (örneğin, yumurta sarısı ve süt lesitini), protein kontaminasyonu ve/veya virüsler gibi patojenik kontaminasyon olasılığını sunar. Bu bağlamda, bu tür lesitin kaynakları, kontaminasyonsuz lipozomlar sağlamak için ek testler gerektirebilmektedir (211, 212). Öte yandan, soya fasulyesinden ekstrakte edilen lesitin, üretim açısından daha ekonomik, daha güvenli ve stabil olarak kabul edilmektedir (213). Bu, soya fasulyesi lesitininin daha stabil (daha az çoklu doymamış yağ asitleri), daha güvenli, bol miktarda bulunabilen ve lipozomların hem laboratuvar hem de farmasötik üretimi için daha az maliyetli olma avantajlarına sahip olduğu anlamına gelir (211). Soya lesitini, iki açil zinciri doymamış olan doğal malzemelerden elde edilen bir fosfolipittir. Doymamış açil zincirlerine sahip doğal kaynaklı fosfolipidler daha geçirgendir ve bu da aktif maddenin adsorbe edilmesini kolaylaştırır (211, 214)

Lipozomlar, hem sentetik hem de doğal fosfolipidlere kolesterol eklenerek oluşturulur. Fosfatidilkolin (lesitin) en yaygın olarak lipozomların hazırlanmasında kullanılır. Her bir fosfolipid türü, bir jel-sıvı geçiş sıcaklığı (Tc) ile karakterize edilir. Bu sıcaklığın altında yağ asidi zincirleri neredeyse kristal bir düzlemdedir. Bu sıcaklığın üzerinde zincirler daha sıvı fazdadır. Zincir eridikçe çift tabakanın kalınlığı azalır ve molekül başına alan artar (215). Bu değişiklikler, X-ışını kırınımı, nükleer manyetik rezonans, elektron spin rezonansı, diferansiyel tarama kalorimetrisi ve floresan depolarizasyonu gibi çeşitli fiziksel tekniklerle araştırılmıştır. Genel olarak, önde gelen zincirleri büyük yan gruplarla doyurmayarak zincir uzunluğunu azaltarak ve gerçek zincirin dallanmasıyla Tc değeri azaltılabilir. Polar bağ grupları da geçiş sıcaklığını etkiler, ancak önde gelen

zincirler kadar etkili değildir. Doğal fosfolipidler (örneğin, yumurta fosfatidilkolini), doymuş ve doymamış öncü zincirlerden oluşan bir kompleks içerir ve çok çeşitli düşük sıcaklık geçişleri ile karakterize edilir (199).

Lipozomlarda fosfolipitler vezikülleri oluşturan ana elementlerdir. Daha yüksek fosfolipid konsantrasyonu kullanımı, daha fazla vezikül oluşmasına neden olur, böylece ilacın hapsolmasının da daha uygun olması beklenir. Daha fazla vezikül oluşur, böylece daha fazla etken madde tutulur. Ancak lesitin konsantrasyonu çok yüksekse, kapsülleme verimliliği azalabilir. Bunun için optimal lesitin – kolesterol konsantrasyonunu belirlemek önemlidir (216).

Tablo 2-1: Lipozom hazırlarken kullanılan fosfolipit örnekleri ve özellikleri (199)

LIPIT TIPI	KISALTILMASI	YÜKÜ	Tc (^{O}C)
Yumurta Fosfatidilkolini	yumurta (egg) PC	0	-15,-7
Dioleoilfosfatidilkolin	DOPC	0	-22
Dilaurilfosfatidli kolin	DLPC	0	0
Dimiristoilfosfatidilkolin	DMPC	0	23
Dipalmltoilfosfatidi kolin	DPPC	0	41
Distearoilfosfatidilkolin	DSPC	0	58
Diizostearoilfosfatidikolin	DIPC	0	---
Sığr Beyni Sfingomiyelini	Brain SM	0	32
Yumurta Fosfatidiletanolamini	yumurta (egg) PE	0	-
Oimristoilfosfatid iletanolamiin	DMPE	0	48
Dimristoilfosfatidi gliserol	DMPG	-	23
Oimristoilfosfatidik Aslt	DMPA	-	52
S1gir Beynl Fosfatidilserini	Brain PS	-	5

2.3.1.2. Lipozomların Üstünlükleri

Lipozomlar, kapsülleme yoluyla ilacın stabilitesini arttırlar (197). İlacın etkinliğini ve terapötik indeksini arttırırlar. Lipozomlar toksik değildir, esnektir, biyouyumludur, biyolojik olarak tamamen parçalanabilir ve sistemik veya sistemik olmayan uygulamalar için immünojenik değildir. Lipozomlar, kapsüllenmiş ilacın toksisitesini azaltabilirler. Hassas dokuların toksik ilaçlara maruz kalmasını azaltmaya yardımcı olabilirler (195). Aktif hedeflemeye ulaşmak için ilacın etki edeceği bölgeye özel ligandlarla birleşme yeteneğine sahiptirler. Etken maddelerin deri katmanlarına girmesi zor olsa da etken maddeler deriden birçok şekilde geçebilir ve lipozom taşıma sistemleri penetrasyonu arttırabilir (217).

Konvansiyonel fosfolipid bazlı veziküler lipozomların taşıyıcı sistem özellikleri kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve penetrasyon arttırıcı etkileri birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (218). Sadece farklı fizikokimyasal özelliklere sahip aktifler için bir taşıyıcı olarak kolaylıkları nedeniyle değil, aynı zamanda lokal biriktirme gerektiren aktiflerin sürekli iletimi için bir rezervuar görevi görmeleri, lipozomları etkili ilaç taşıyıcı sistemler haline getirmektedir (219).

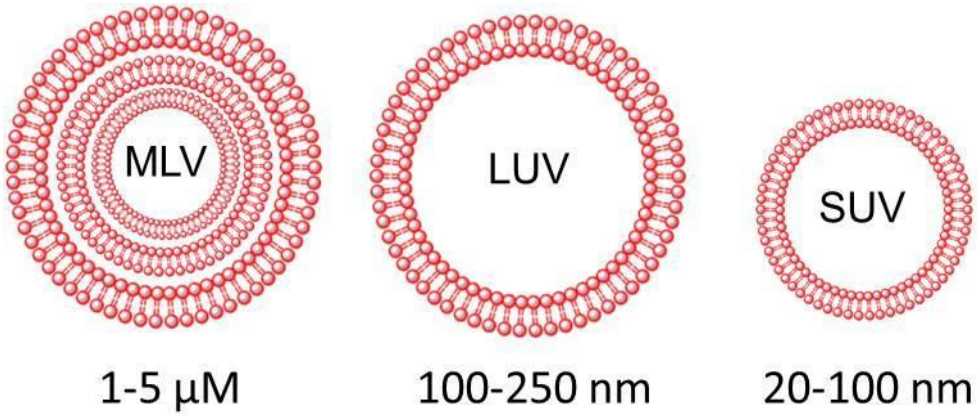
2.3.1.3. Lipozomların Sınıflandırılması

Lipozomların boyutları çok küçük (0.025 μm) ile büyük (2.5 μm) veziküller arasında değişebilmektedir. Ayrıca lipozomlar bir veya iki katmanlı olabilirler. Vezikül boyutu, lipozomların yarı ömrünün belirlenmesinde önemli bir parametredir. Hem boyut hem de çift tabaka sayısı, lipozomlardaki ilaç kapsülleme miktarını etkiler (195).

Lipozomlar, büyüklüklerine ve çift katmanlı sayılarına göre iki kategoride sınıflandırılabilir: çok katmanlı veziküller (MLV) ve tek katmanlı veziküller (199).

Tek lamelli veziküller ayrıca iki kategoriye ayrılabilir: büyük tek lamelli veziküller (LUV), küçük tek lamelli veziküller (SUV) (Şekil 2-14) (199).

Tek katmanlı lipozomlarda vezikül, sulu çözeltiyi çevreleyen tek bir fosfolipid çift katmanlı küreye sahiptir. Çok katmanlı lipozomlarda veziküller soğan yapısına sahiptir. Klasik olarak, diğerinin iç kısmında daha küçük boyutlu birkaç tek katmanlı vezikül oluşacak ve su katmanlarıyla ayrılmış eşmerkezli fosfolipid kürelerin çok katmanlı bir yapısını oluşturur (220).



Şekil 2-14. Vezikül Çeşitleri ve Çapları (221)

2.3.1.4. Lipozom Hazırlama Yöntemleri

Lipozom hazırlama yöntemleri Şekil 2-15'te belirtildiği gibi dört temel aşamadan oluşur:

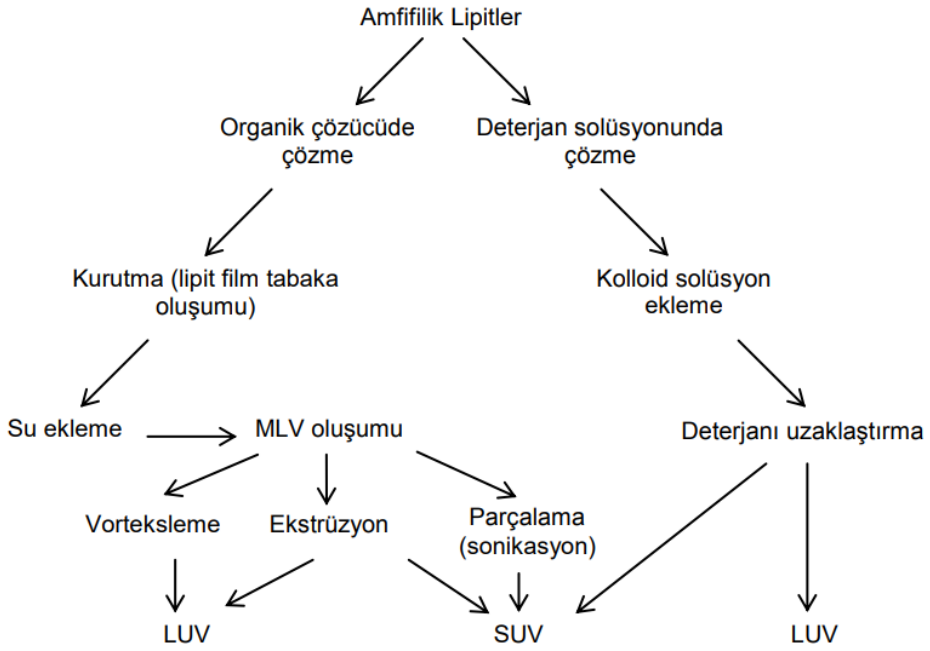
1. Lipidlerin organik çözücüde çözündürülüp ardından organik çözücünün kurutulması

2. Lipidin sulu ortamda dağıtılması

3. Elde edilen lipozomun saflaştırılması

4. Nihai ürünün analiz edilmesi

Lipozom hazırlama üç ana adımdan oluşur: vezikül oluşumu, vezikül boyutunun küçültülmesi ve saflaştırma. Bir üretim ölçeğine, aktif kapsülleme aktivitesine, aktif maddenin fizikokimyasal özelliklerine ve uygulama yolu gibi diğer yönlere dayalı olarak çeşitli hazırlama yöntemleri incelenmiştir (222).



Şekil 2-15: Lipozom hazırlama yöntemleri (223)

Lipozom hazırlama yöntemleri, pasif yükleme teknikleri ve aktif yükleme teknikleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (224).

2.3.1.4.1. Pasif Yükleme Teknikleri

Pasif yükleme teknikleri mekanik dispersiyon, çözücü dispersiyonu ve deterjanı uzaklaştırma yöntemleri olmak üzere üç ana yöntemden oluşmaktadır (224).

2.3.1.4.1.1. Mekanik Dispersiyon

Sulu bir ortamda lipit hidratasyonu ve organik çözücülerin değişimini içeren en eski ve en yaygın kullanılan lipozom hazırlama yöntemidir. Bu yöntemde, lipozomu oluşturacak olan lipitler kloroform gibi organik çözücülerde çözdürülür. Ardından bu çözücü ince bir film oluşana kadar düşük buhar basıncında bir evaporatör altında buharlaştırılarak uzaklaştırılır. Lipit film oluşur. Oda sıcaklığında, bu lipit film hidrate edilir. Daha sonra, kendi anafaz geçiş sıcaklığının üzerinde bir sıcaklıkta su içerisinde 1 dakika kadar bekletilir ve sudan çıkarılıp vortekslenir. Bu işlemler 15 dakika tekrarlanır. Böylece çok katmanlı veziküller oluşur (225).

Lipid hidratların hazırlanması, tüm lipidlerin ve hidrofobik malzemelerin homojen olarak karıştırılmasıyla başlar ve bunlar organik bir çözücü içinde çözdürülür. Kurutma aşaması, çözeltinin bir rotavapor yardımıyla azaltılmış basınç altında bir cam kap içinde kurutulmasını içerir. Genellikle bu adım, kloroform: metanol karışımları kullanılarak gerçekleştirilir. Tam kuruluk elde etmek için bir liyofilizatör de kullanılabilir (226).

Önceki adımda elde edilen filmin dağılımı, daha sonra cam kaba sulu bir ortamın eklenmesiyle sağlanır. Tutulacak maddeler hidrofilik ise çözülür ve bu sulu ortam ile ilave edilir. Bu yöntem hidrofobik maddelerin kapsüllenmesi için faydalıdır, hidrofilik maddelerin verimi ise %5-15 gibi düşüktür (225). Daha büyük hacimlerin üretimi için, organik çözücü, yuvarlak tabanlı bir şişenin kenarlarında ince bir lipit film verecek şekilde buharlaştırıcıdan çıkarılmalıdır ve lipit film, şişeyi bir vakum pompasına yerleştirerek gün boyunca iyice kurutulur. Filmin kurutulmasından sonra, kuru lipit filmin hidratasyonu, kuru lipit kabına sulu bir ortam eklenerek ve çalkalanarak gerçekleştirilir. Nemlendirici ortamın sıcaklığı, kuru lipite eklenmeden önce lipidin camsı geçiş sıcaklığının (Tc) üzerinde olmalıdır. Çözücü su ortamının eklenmesinden sonra, lipit süspansiyonu, hidratasyon süresi boyunca Tc'nin üzerinde tutulmalıdır. Yüksek geçişli lipitler için bu, lipit süspansiyonunun yuvarlak tabanlı bir şişeye aktarılması ve şişenin vakumsuz döner buharlaştırma sistemine yerleştirilmesiyle kolayca gerçekleştirilebilir (226, 227).

Cam balonun, lipit süspansiyonunun Tc'sinin üzerindeki bir sıcaklıkta tutulan bir ılık su banyosunda döndürülmesi, lipidin, yeterli çalkalama ile sıvı fazda sıvılaşmasına olanak tanır. Hidratasyon süresi lipit türleri ve yapısı arasında biraz değişebilir, ancak kuvvetli çalkalama veya karıştırma ile 1 saatlik bir hidratasyon süresi şiddetle tavsiye edilir. Ayrıca, indirgemeden önce vezikül süspansiyonunun gece boyunca kalmasına izin verilmesinin, boyutlandırma sürecini kolaylaştırdığı ve boyut dağılımının homojenliğini geliştirdiği düşünülmektedir (225-227).

Heterojen ve büyük yapılı olan çok katmanlı lipozomlar, vorteksleme, ekstrüzyon, sonikasyon gibi metodlarla küçük tek lamelli ve büyük tek lamelli veziküllere dönüştürülmesi mümkündür. Ekstrüzyon işlemi sırasında ekstrüzyon cihazı kullanılır. Bu cihaz ile istenen por çapına göre lipozomlar ayrılabilir. Lipit

süspansiyonunun boyut ayarı sonikasyon ile de yapılabilir. Sonikasyon cihazı yardımıyla, çok katmanlı lipozomlar enerji uygulanmasıyla 20-100 nm çapında küçük tek katmanlı lipozomlara dönüştürülebilir. Bu işlem için en yaygın olarak kullanılan araçlar ultrasonik banyo ve prob sonikatörlerdir. Ultrasonik banyo büyük hacimli seyreltilmiş MLV'ler için uygulanırken, prob sonikatörler vezikülleri parçalamak için yüksek enerji girişi gerektiren daha küçük bir süspansiyon hacmi için daha uygundur. Prob sonikatör kullanımı, probun hem ortamından hem de metal ucundan kontaminasyon riskini içeren açık bir sistemdir. Bu yöntemde veziküllerin ortalama boyutu ve dağılımı, bileşim, konsantrasyon, sıcaklık, sonikasyon süresi ve gücü, hacim ve sonikatör ayarı gibi birçok faktörden etkilenir (225, 228).

2.3.1.4.1.2. Çözücü Dispersiyonu

Bu yöntem, çözünmüş organik lipid çözeltisinin, içine giren malzemeleri içeren sulu ortama enjeksiyonunudur. MLV'ler, organik ve sulu bölgeler arasındaki arayüzde hemen oluşur (220).

Bu yöntemin üç farklı tekniği vardır. Bunlar eter enjeksiyonu, etanol enjeksiyonu ve ters fazlı buharlaştırmadır. Eter enjeksiyonunda, dietil eter veya eter-metanol karışımı içinde çözülmüş bir lipit çözeltisi, kapsüllenecek malzemenin sulu çözeltisine kademeli olarak 55 °C ila 65 °C'de veya yüksek basınç altında enjekte edilir. Çözücü (eter) daha sonra vakum altında çıkarılır, böylece lipozomların oluşması sağlanır (229).

Etanol enjeksiyon yönteminin prosedürü, eter enjeksiyonu yöntemi ile aynıdır. Tek farkı, çözücü olarak etanol kullanılır. Bu yöntemin sınırlaması, lipozomların çok seyreltilmiş olmasıdır (230).

Ters fazlı buharlaştırma yöntemi, lipozomlarda kapsüllenecek suda çözünür moleküller ve amfifilik moleküllerin içinde çözündüğü bir organik faz içeren tamponlu bir sulu faz karışımının sonikasyonuyla oluşturulan ters misellerin oluşumuna dayanır. Organik çözücünün yavaş eliminasyonu, bu ters çevrilmiş misellerin viskoz jel formuna dönüşmesine yol açar (195).

Çözücü dispersiyonu yöntemlerinin sınırlamaları; yanlış karıştırmanın heterojen lipozomlar üretebilmesi, su ile azeotrop oluşturduğu için etanolün zor

uzaklaştırılması, biyolojik olarak aktif çeşitli makromoleküllerin düşük miktarlarda etanol varlığında bile inaktif olabilmeleridir (231).

2.3.1.4.1.3. Deterjan Uzaklaştırma

Lipitleri çözmek için kritik misel konsantrasyonlarında (CMC) deterjanlar kullanılır. Deterjan çıkarıldığında, miseller fosfolipitler açısından giderek daha zengin hale gelir ve LUV oluşturur. Bu yöntem, tekrarlanabilir lipozomlar elde etmek için en iyisi olsa da, lipozomlar içindeki deterjan kalıntılarını çıkarmak için daha fazla işlem gereklidir. Bu yöntemin sınırlamaları, nihai çözeltide düşük lipozom konsantrasyonu olması, düşük lipofilik ilaç tutulması, zaman alıcı olması, deterjanın çıkarılması sırasında suda çözünebilen çok küçük bileşiklerin giderilmesidir (231).

MLV'lerin oluşumunu takiben, vezikül boyutlarını küçültmek için çeşitli boyutlandırma yöntemleri uygulanır çünkü bunlar çalışmak için çok büyüktür ve popülasyonda oldukça heterojendir. Boyut küçültme için en çok tercih edilen teknikler ultrasonikasyon ve ekstrüzyondur (226).

2.3.1.4.2. Aktif Yükleme Teknikleri

Aktif yükleme teknikleri, içinde bazı tamponlar veya tuz çözeltileri bulunan önceden oluşturulmuş lipozomları, ilaç molekülleri ile doldurmak için kullanılır. Bu işlem, çok düşük düzeyde bir ilaç kaybı ve çoğu durumda uygun bir ilaç-lipid oranı sağlar (231).

2.3.1.4.2.1. Deterjan Diyaliz Yöntemi

Bu yöntemde lipozomlar, misellerden hazırlanır. Deterjan çözücü olarak görev görür. Deterjan-lipit pelletleri oluşur. Lipit-protein karışımından proteinlerin ayrıştırılması için deterjan çözücü olarak kullanılır. Kolloid çözeltiler ise tampon çözelti olarak kullanılır. Lipozom dispersiyonları diyaliz edilir ve süzülür. Hızlandırılmış kontrollü diyaliz, jel filtrasyon veya santrifüj gibi metodlarladaha sonra deterjan uzaklaştırılır. Ortalama çapları 100 ila 200 nm arasında değişen oldukça homojen lipozom dispersiyonları elde edilebilir. Bu yöntem küçük veya büyük tek katmanlı veziküller elde edilmek istendiğinde kullanılabilir (231).

2.3.1.4.2.2. Mikroakışkan Yöntemi

Mikroakışkan yöntem, kontrollü lipozom hazırlama için Jahn ve diğerleri tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde, lipidler izopropil alkol içinde çözülür ve daha sonra sulu ortam içeren ikili kanalların merkezinden geçer. İzopropil alkol içindeki lipitlerin akışı, daha sonra karıştırılarak lipozomlar oluşturur. Lipozomların boyut ve boyut dağılımı, mikroakışkan kanallardaki laminer akış ve lipid konsantrasyonları tarafından kontrol edilir. Bu, kendiliğinden oluşan lipozomlar elde etmek ve ilacı doğrudan kapsüllemek için etkili bir yöntemdir (231).

2.3.1.5. Lipozomların Karakterizasyonu

Lipozom karakterizasyonunun en kritik parametreleri arasında görünüm, ışık geçirgenliği, boyut dağılımı, kapsülleme verimliliği, bileşim, bozunma ürünlerinin varlığı ve stabilite yer alır (232, 233).

2.3.1.5.1. Lipozomların Kapsülleme Verimliliği

Bir ilaç taşıyıcı sistemde ilaç kapsülleme etkinliğini belirlemek için genellikle iki yöntem vardır. İlk yöntemde, serbest ilaç nanotaşıyıcıdan ayrılıp ölçülürken, ikinci yöntemde ise serbest ilaç ve nanotaşıyıcı doğrudan ayrılmaz ve ölçülmez. İlk yöntem, kapsüllenmiş ilacın stabil olmasını ve ayırma sırasında sızıntı olmamasını gerektirir. Ayırma yöntemleri arasında diyaliz, HPLC, yüksek hızlı santrifüjleme, santrifüjlü ultrafiltrasyon ve mikro kolonlu santrifüj yer alır. İkinci yöntem esas olarak floresan söndürme ve elektron spin rezonans spektroskopisini kullanır (232).

2.3.1.5.2. Lipozomların Partikül Boyutu, Partikül Dağılımı ve Zeta Potansiyel

Lipozomların karakterizasyonunda temel kriterlerden biri partikül büyüklüğü ve partikül büyüklüğü dağılımının belirlenmesidir.

Parçacık boyutu, dinamik ışık saçılımı (DLS) kullanılarak ölçülür. Bu teknik, parçacıkların Brownian hareketinden dolayı oluşan saçılan ışığın yoğunluğundaki zamana bağlı dalgalanmaları ölçer. Bu, uygulanan ışığın önemli ölçüde saçılmasına neden olur. Bu yoğunluk dalgalanmalarının analizi, bir boyut dağılımına dönüştürülen parçacıkların difüzyon katsayılarının belirlenmesini

sağlar. Lipozomun ortalama vezikül boyutu ve boyut dağılım profili, Mie'nin ışık saçılması teorisini takip eden Malvern partikül boyutu analizörü kullanılarak belirlenir (233).

Işık yoğunluğundaki dalgalanma derecesi, partikül çapına yayılan partiküllerin difüzyon hızıyla ilişkili olduğundan (daha küçük partiküller daha büyük olanlardan daha hızlı yayılır), partikül boyutu otomatik olarak tahmini saçılan ışık miktarından çıkarılır (233).

Bir parçacığın zeta potansiyeli, parçacığın belirli bir ortamda edindiği toplam yüktür. Bir lipozom preparasyonunun zeta potansiyeli, lipozomların in vivo kaderini tahmin etmeye yardımcı olur. Zeta potansiyeli ölçümleri ile uğraşırken, DLS, uygulanan elektrik alan nedeniyle partikül hareketinin neden olduğu saçılan ışık yoğunluğundaki değişikliklere ulaşarak yüzey yükünün belirlenmesine izin verir (233, 234).

Rutin analizler için basit, hızlı ve güvenilir bir yöntem olmasının yanı sıra DLS, bir ortamdan ölçüm almak ve birkaç nanometreden birkaç mikrometreye kadar çok çeşitli boyutları değerlendirmek dahil olmak üzere birçok avantaj sunar. Bununla birlikte, DLS, bireysel partikülleri agregatlardan ayırt etme zorluğu ve kontaminasyona karşı yüksek hassasiyet gibi bazı sınırlamalar göstermektedir (234).

Zeta potansiyeli veziküller arası itme veya çekme kuvvetinin ölçüsüdür. Zeta potansiyel değerleri veziküler sistemlerin kolloidal stabilitesi hakkında bilgi sağlar. Zeta potansiyeli, dispersiyon ortamı ile dispersiyon halindeki partikülün yüzeyi arasındaki elektriksel potansiyel farkıdır. Daha büyük zeta potansiyeli daha kararlı bir dağılım öngörür, bu da süspansiyondaki tüm parçacıkların birbirini itme eğiliminde olacağı ve böylece kümelenmeyi önleyeceği anlamına gelir. Lipozomların zeta potansiyeli, lipozomlar fosfolipidlerden yapıldığında genellikle negatiftir çünkü fosfolipidlerin fonksiyonel grupları negatiftir. Ancak, yükün işareti en önemli nokta değildir. Mutlak değeri 30 mV'dan büyük zeta potansiyel değeri iyi stabiliteyi gösterir, partiküller arasında topaklanmayı önleyen yeterli itme kuvveti sağlar. Normalde, +30 mV'tan büyük veya -30 mV'tan küçük zeta potansiyeline sahip partikül süspansiyonları kararlı olarak kabul edilir (235).

2.3.1.6. Lipozomların Stabilitesi

Farmasötik bir ürünün stabilitesi genellikle, ilaç taşıyıcı sistemin ürünün kendisinin belirtilen veya önceden belirlenmiş limitleri içinde kalma kapasitesi olarak tanımlanır (236). Farmasötik bir ürünün stabilitesi, formülasyonun kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik stabilitesi ile ilgili olarak belirli sınırlar içinde kalma yeteneği şeklinde açıklanabilir. Stabilite testi programları iki bölümden oluşur. Bunlar, hazırlama sonrası ürün karakterizasyonu ve depolama sırasında ürün stabilitesidir. Lipozomlar, bir ilaç taşıyıcı sistem olarak birçok avantaj sunmasına rağmen, stabiliteleri uzun süreli depolama için sulu dispersiyonlardaki fiziksel ve kimyasal dengesizlikler sebebiyle azalabilir (237).

Lipozomların kiyasal stabilitesini fosfolipitlerin kimyasal kararlılığı belirler. Fosfolipidler çift tabakanın omurgasını oluşturduklarından, kimyasal dayanıklılıkları önemlidir. İki tür kimyasal bozunma reaksiyonu fosfolipid çift katmanlarının performansını etkileyebilir. Bunlar, yağ asitlerini gliserol omurgasına bağlayan ester bağlarının hidrolizi ve doymamış asil zincirlerinin (varsa) peroksidasyonudur. Lipidlerin oksidasyonu ve hidrolizi, kısa zincirli lipidlerin ortaya çıkmasına neden olabilir ve bu durum daha sonra zarda çözünür maddeler oluşmasına ve lipozom ürünlerinin kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonu, formülasyona alfa-tokoferol gibi antioksidanların eklenmesiyle önlenebilir. Ayrıca, lipozomların fiziksel stabilitesini ve raf ömrünü etkileyen agregasyon/flokülasyon ve füzyon/birleşme gibi fiziksel süreçler, lipozomla ilişkili ilacın kaybına ve boyutta değişikliklere neden olabilir. Agregasyon, daha büyük lipozomların oluşumudur; bu birimler hala bireysel lipozomlardan oluşur. Genellikle nötr lipozomlarda, çözücü tam olarak uzaklaştırılamadığında görülen bu durum, Van der Waals kuvvetlerinden kaynaklanır. Birbirine temas eden membranlar daha büyük veziküllerin oluşmasına sebep olur. Lipozomların stabilitesi ile ilgili ortaya çıkabilen bir diğer sorun, lipozom içerisine kapsüllenen maddenin dışarı sızmasıdır. Küçük moleküler ağırlığa sahip (<1000 MA) maddelerde bu durum daha olasıdır. Bunlara ek olarak sıcaklık, stabiliteyi önemli ölçüde etkileyen çevresel bir faktördür. SUV'ler faz gçiş sıcaklığıın altında bir sıcaklıkta hazırlandığında füzyon sorunuyla karşılaşılabilirken, faz geçiş sıcaklığının üzerinde lipozom hazırlanmasıyla

membran yapısında hasar görülebilmektedir. Bunu engellemek için lipozomlar faz geçiş sıcaklığından uzak bir sıcaklıkta saklanmalıdır. Stabilite sorunları, inert nitrojen gazı kullanılarak, taze çözücüler ve taze saflaştırılmış lipidler kullanılarak, yüksek sıcaklıklardan kaçınılarak ve antioksidanlar eklenerek de çözülebilir (237, 238, 239).

Lipozomların stabilitelerini arttırmak için, liyofilizasyon, dondurma, sprey kurutma ve süper kritik akışkan teknolojisi gibi birçok yöntem araştırılmıştır (238).

Lipozomlar kolloidal sistemlerdir. Lipozomların stabilitesi hem fiziksel hem de kimyasal olarak değerlendirilebilir. Genel olarak, fiziksel özellik, lipozom yapısının korunmasını tanımlar ve kimyasal özellik, lipozomal bileşenlerin moleküler yapısını belirtir. Lipozom formülasyonunun kararlı olabilmesi için hem partikül boyutu dağılımını hem de kapsüllenmiş madde miktarını koruması gerekir (239).

2.5. Deriden Geçişin Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

Cilde uygulanan bir ilacın etki göstermesi için öncelikle deriden emilmesi gerekmektedir. İlaçların deriden emiliminin değerlendirilmesi için doğru ve tekrarlanabilir yöntemlerin kullanılması, formülasyonların kalite ve güvenliliğinin değerlendirilmesi açısından esastır. Deriden geçişin ölçülmesinde kullanılan in situ ve in vivo teknikler, yaşayan insanların veya deney hayvanlarının derisinin kullanılmasıyla gerçekleştirilir (240). Deri biyopsisi ya da cilde negatif basınç uygulayarak oluşan kabarcıktan elde edilen sıvıdan ilaç geçişinin ölçülmesi yöntemleri invaziv oldukları için çok tercih edilmemektedir. Ex vivo bant sıyırma yönteminde, test edilecek formülasyon topikal olarak uygulanır ve stratum korneumun hücre katmanları, yapışkan filmler kullanılarak ilgili cilt alanından sırayla çıkarılır. Bu yöntemde bant sıyırma hızı değişkenlik gösterebileceğinden, sonuçlar hataya açık olabilmektedir. Mikrodiyaliz yönteminde ise, mikrodiyaliz katateri ilgili dokuya implante edilerek çözünen moleküller interstisyel sıvıdan tayin edilir. Mikrodiyaliz yönteminin dezavantajı, mikrodiyaliz probunun kullanımının doku morfolojisini değiştirerek mikrodolaşımın, metabolizma hızının veya fizyolojik bariyerlerin bütünlüğünün bozulmasına neden olabilmesi ve küçük analit konsantrasyonlarını tespit etmek için hassas analitik yönteme ihtiyaç duyulmasıdır (241).

İn vitro tekniklerle deriden absorpsiyonun ölçülmesi ise, cansız stratum korneumdan pasif difüzyonla geçen ilaç miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. İn vitro yöntemler, Franz difüzyon hücresi, dönen difüzyon hücresi gibi difüzyon hücresi testlerini kapsamaktadır. İn vitro deneylerin başlıca avantajları; deneylerin gerçekleştirilmesinin daha kolay olması, daha az maliyetli olmaları ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin kontrolünün daha kolay olmasıdır. Örnekleme sıklıkla doğrudan derinin altından yapılabildiğinden, doğru emilim oranları belirlenebilmektedir (240).

2.5.1. Franz Difüzyon Hücresi

Adından da anlaşılacağı üzere, in vitro transdermal difüzyon yöntemi T.J. Franz tarafından 1975 yılında geliştirilmiştir. Franz'ın raporu, o zamana dek in vivo-in vitro transdermal absorpsiyon arasındaki ilişkiye ilişkin daha önce sistematik bir araştırma yapılmadığını öne sürmektedir (11). Yöntem, az değişken içerdiği ve in vivo deneylere olan ihtiyacı azalttığı için daha etik ve tekrarlanabilir bir değerlendirme tekniğine sahip olduğundan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (242).

Franz difüzyon hücreleri, bir zarla ayrılmış bir donör odası ve bir reseptör odasından oluşur - örneğin, deri veya deri eşdeğeri (Şekil 2-16). Donör bölmesinde en üstte örnek giriş yapılır. Bir akış difüzyon hücresinde, alıcı ortam, belirli bir zaman aralığı boyunca analiz için numunelerin çıkarıldığı alt kısımda dolaştırılır (11).

Kozmetik bileşenlerinin ilk değerlendirmesi olarak in vitro test yapılır. Kozmetik preparatlar franz difüzyon hücreleri ile geçirgenlik ve stabilite açısından değerlendirilirler. Bu testlerin değerli olması için, in vitro ve in vivo veriler arasındaki korelasyon, insan ve hayvan testlerini devre dışı bırakmak ve daha sonra bu tür deneylerle ilgili düzenlemeleri atlamak için zorunludur (12). 2013 yılında kozmetiklerin hayvanlar üzerinde denenmesine ilişkin AB yasağının ardından, doğru in vitro verilerin önemi artmıştır (243).

Franz difüzyon hücresi, insan derisine uygulanan topikal preparatlardan epidermise veya dermise nüfuz eden ve sistemik dolaşıma geçen bileşen miktarını ölçen veya tahmin eden difüzyon testleri için kurulmuş bir sistemdir. Franz hücresi penetrasyon ya da difüzyon çalışmaları, topikal ürünlerin etkinliğini araştırmak için

önemli bir araştırma yöntemi haline gelmiştir. Elde edilen sonuçların in vivo korelasyonlarının yüksek olması in vivo deneylere olan ihtiyacı azalttığı için Franz difüzyon sistemleri çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Franz difüzyon testinin diğer avantajları, daha az değişken içermesi, etik ve tekrarlanabilir bir değerlendirme tekniği olmasıdır. Franz difüzyon hücreleri, yarı katı jeller, kremler ve merhemler gibi müstahzarlardaki tek bir hammaddenin veya daha fazla aktif maddenin difüzyonunu incelemek için kullanılabilir (244).

Franz hücresi difüzyon testlerinde kullanılan membranlar biyolojik (insan, fare, domuz) veya sentetik (polimerik, selüloz bazlı) olabilir. Franz difüzyon hücre aparatı ile tam cilt, dermatomlu cilt, malzemelerin cildin farklı katmanlarına penetrasyon profillerini test etmek için sadece epidermis veya stratum corneum kullanılabilir (245).

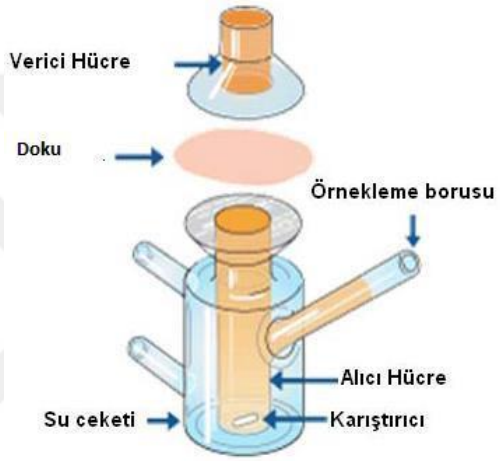
Zarlar, hücrenin üst ve alt odaları arasına yerleştirilir. Hücre sabit bir sıcaklıkta (32^{o}C veya 37^{o}C) tutulur. Bu, suyun reseptör odasının dışında sirküle edildiği ceketli bir hücre kullanılarak sağlanabilir. Diğer bir seçenek ise nemin ve sıcaklığın yakından izlenebildiği bir iklim odası kullanmaktır. Ardından çeşitli solüsyonlar hazırlanır ve tam bir deri yapısı oluşturmak için alıcı hücreye enjekte edilir (11).

Alıcı ortam olarak gözlemlenen maddenin çözünebildiği bir sıvı tercih edilir. Fosfat tamponu çözeltisi (PBS), pH ve tuz içeriği açısından vücut sıvısını yakından taklit ettiği için ağırlıklı olarak kullanılır. Hidrofilik bileşenler için, reseptör solüsyonu olarak tuz veya tamponlu salin solüsyonu önerilebilirken, topikal formülasyonlarda kullanılan lipofilik bileşenleri bağlamak veya çözmek için serum albümini veya iyonik olmayan yüzey aktif maddeler içeren diğer uygun çözücüler kullanılabilir (246, 247).

Hücre içindeki solüsyonlar zar ile sürekli temas halinde olmalı ve uygun oranda manyetik karıştırıcı ile iyice karıştırılmalıdır. Test edilecek müstahzarlar, zar üzerine ölçülü miktarlarda uygulanır. 1, 2, 4, 6, 8, 24 saat gibi önceden belirlenmiş zamanlarda yayılan miktarları izlemek için reseptör solüsyonundan numuneler toplanır. Kantitatif testler için verici veya alıcı ortamdan ekstrakte edilen numuneler, UV-VIS spektrofotometrisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) gibi farklı analiz teknikleri ile analiz edilebilir. Böylece

maddenin konsantrasyonu önceden oluşturulmuş bir standart kalibrasyon eğrisinden türetilir (248).

İn vitro difüzyon çalışmalarında insan derisinin kullanılmasının önünde çeşitli engeller vardır. İnsan derisinin parçadan parçaya değişkenliği yüksektir, deri örnekleri pahalıdır ve elde edilmesi kolay değildir. İnsan dokusunun kullanımı aynı zamanda zayıf stabilite, depolama koşullarına duyarlılık, biyolojik tehlike endişeleri ve yüksek maliyet gibi deneysel zorluklar da ortaya çıkarmaktadır (249).



Şekil 2-16: Franz Difüzyon hücresi (250)

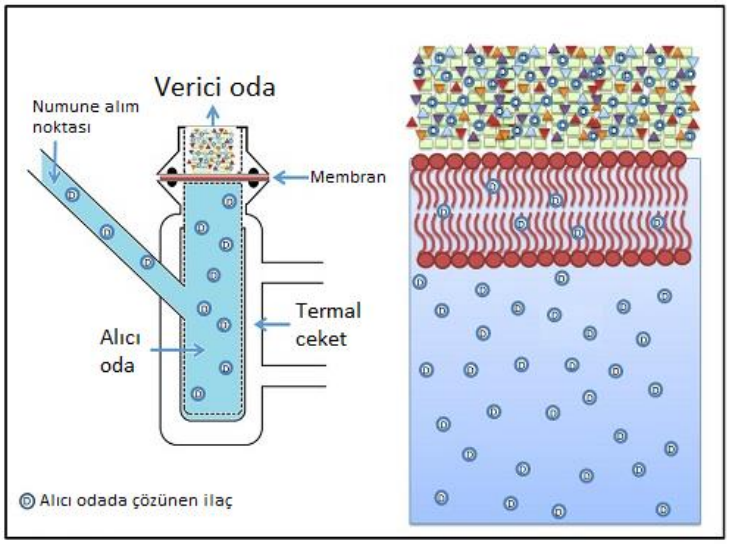
Biyopsilerden elde edilen insan veya hayvan derisinin kullanılmasına ek olarak, transdermal difüzyon çalışmaları için ticari olarak temin edilebilen, insan derisine alternatif olarak, insan derisiyle iyi uyum sağlayan sentetik bazlı zarlar geliştirilmiştir. Bu zarların örnekleri SkinEthic™ ve EpiSkin™, epiCS™ – cilt eşdeğerleri olarak kullanılan 3D hücre kültürleridir. Deri eşdeğeri zarların üstünlükleri, sentetik veya kültürlü membranların kolaylıkla temin edilebilir olması, uygun maliyetli olması ve cilt dokusuna kıyasla yapısal olarak daha homojen olmasıdır (249, 250).

Her bir cilt modeliyle ilişkili, onları birbirinden farklılaştıran çeşitli biyolojik ifadeler vardır. Araştırmalar, doğal dokunun yerini alan sentetik membranların, gerçek cilt kullanımıyla ilişkili patolojik etkileri (örneğin, cilt bütünlüğü, nem içeriği, yoğunluk, altta yatan hastalık) ortadan kaldırarak

tekrarlanabilirlik sorunlarının üstesinden gelmeye yardımcı olabileceğini düşündürmektedir. Buna ek olarak, deri eşdeğerleri etik olarak daha uygundur (250).

Yöntem geliştirme için, deri eşdeğeri yerine daha basit, yarı geçirgen bir zar kullanılabilir. Bunlar, molekül veya parçacık boyutuna dayalı bir elek olarak kabul edilebilir ve temel amaçları, numune formülasyonunu (veya solüsyonunu) ve alıcı ortamı ayırmaktır. Rejenere selülozdan oluşturulan diyaliz membranları buna bir örnektir (242).

Membrandaki bir dizi gözenek boyutu, istenen boyut dağılımının iyi bir şekilde ayrılmasını sağlar. Yarı geçirgen zardan partiküllerin derişim gradientine göre geçişi Şekil 2-17'de gösterilmektedir. Zar, daha küçük parçacıkların nüfuz etmesine izin verir ve daha büyük parçacıkları engeller (242).



Şekil 2-17: Franz difüzyon hücresinde ilacın zardan alıcı odaya geçişi (242)

Franz difüzyon hücrelerinde polimerik veya sentetik membranların kullanımı yaygın bir uygulamadır ve bu membranlar ticari olarak mevcuttur. Sentetik membranlar, test edilecek ürünlerde formüle edilen moleküllerin penetrasyonunu kontrol eden polimerik makromolekül tabakalarından yapılır. Bu membranlar polisülfon, polikarbonat, poliakrilonitril ve polipropilen veya yarı sentetik selüloz polimerleri (selüloz asetat, selüloz nitrat ve rejenere selüloz)

olabilir. İdeal bir sentetik membran inert olmalı, ilaç penetrasyonunu engellememeli ve iyi geçirgenlik sağlamalıdır (249).

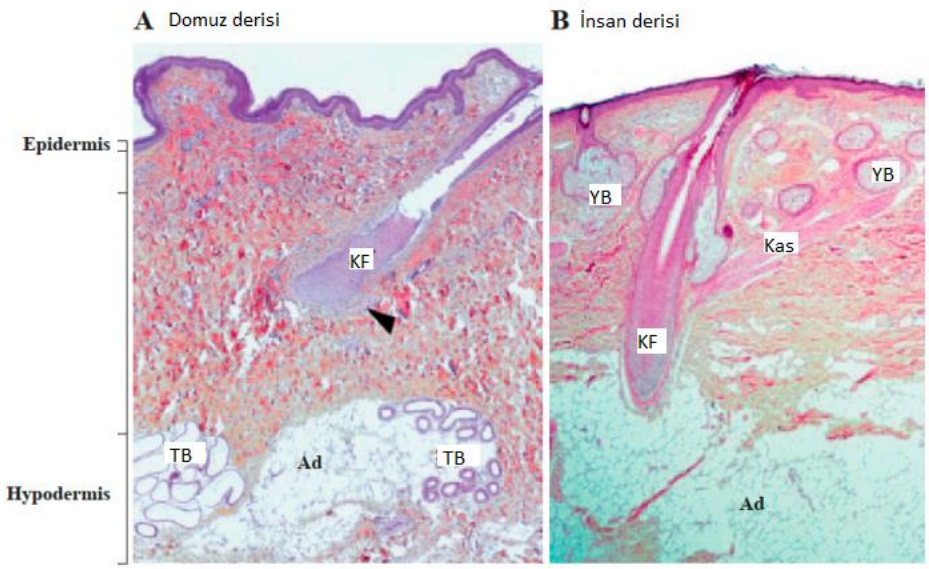
Yarı sentetik ve sentetik membranların geçirgenliği mikrofiltrasyon membranları için gözenek çapı ile ifade edilir. Ultrafiltrasyon membranları içinse 'moleküler ağırlık ayırma sınırı (MWCO) terimi kullanılır. Moleküler ağırlık ayırma sınırı membranın minimum ayırma oranının %90 olduğu moleküler ağırlığı ifade eder ve membranın performansını etkileyen bir parametredir. Mikrofiltrasyon membranlarının, gözenek boyutu genellikle 0.1µm ile 1µm arasındadır. Ultrafiltrasyon membranlarının gözenek boyutu, genellikle 0.01 µm ila 0.1 µm arasında, moleküler ağırlık ayırma sınırı, 1.000 Da ila 300.000 Da arasında değişmektedir. Franz difüzyon hücresi deneylerine başlamadan önce, moleküler ağırlık ayırma sınırına göre membran seçimi yapılır. Debi, membran tipi, gözeneklilik, kalınlık, test edilecek bileşenin moleküler ağırlığı gibi parametreler doğru membran seçimi için önemlidir (251).

Yapılan bir çalışmada membranların akış hızları incelenmiş ve ibuprofenin akış hızının polimerik membranlarla selülozik membranlara göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Etken maddenin zarlardan hızlı akışının, selüloz zarın yüksek gözenekliliğinden (%66-84) kaynaklandığı sonucuna ulaşılmıştır (246).

Birçok difüzyon deneyinde, kullanılan sentetik membranlar reseptör solüsyonda bekletilerek şartlandırılmıştır. Reseptör bölümüne manyetik bir çubuk konur, membran hücrenin alıcı kısmına kelepçeler kullanılarak yerleştirilir. Hücrelerin sıcaklığını sabit bir sıcaklıkta tutmak için hücrelerin ceketi boyunca suyun sirkülasyonu ve karıştırıcılar, test çözeltileri Franz difüzyon sisteminin donör bölgesine doldurulmadan önce sistemi koşullandırmak için çalıştırılır. Test solüsyonu (formülasyon) donör bölmesine doldurulur. Penetran molekülün geri sızmasını önlemek için reseptör çözeltisindeki konsantrasyonun bu çözeltideki çözünürlüğünün %10'unu geçmemesi sağlanmalıdır (246, 249-251).

Dermatom edilmiş insan derisi eksplantlarında yapılan in vitro permeasyon çalışması, ilaç penetresyonunu değerlendirmek için altın standart olarak kabul edilir. Bununla birlikte, etik ve ekonomik nedenler, insan derisinin mevcudiyeti ve kullanımı için büyük bir sorun teşkil etmektedir. Deri greft uygulamaları için toplanır ve normal tuzlu su içinde propandiol veya gliserol gibi maddeler

kullanılarak saklanır. Uzun süreli depolama nedeniyle, cilt canlılık ve enzimatik aktiviteden yoksundur, bu da cilt geçirgenliğinde değişikliklere neden olur (249, 250, 252). In vitro transdermal permeasyon çalışmaları için, doğal membran olarak çok sayıda hayvan modeli kullanılmaktadır. Hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, insan derisiyle doğrudan karşılaştırılabilirliğe veya insanlarda bulunan transdermal absorpsiyona benzerliğe dayanmaktadır. Domuz gibi hayvanlardan (kobay, sıçan, fare gibi kemirgenler, primatlar, tavşan) izole edilmiş deri kolayca elde edilebilmeleri, canlılık ve enzimatik aktivite ile deri permeasyon çalışmalarından önce taze olarak eksize edilebilmeleri ve daha az değişkenlik göstermeleri nedeniyle rutin olarak insan derisine alternatif olarak düşünülmüştür. Bu tür modellerde domuz derisi, insan derisine pek çok benzerliği (yağ birikintileri, foliküller, yoğunluk) olduğu ve kolay erişilebilir olduğu için yaygın olarak tercih edilir. Domuz derisinin tüy yoğunluğu (~20 tüy/cm2), Langerhans hücreleri gibi yapıların varlığı, stratum corneum kalınlığı, glikosfingolipidler ve seramidler gibi içerikler, tabakalı, çok tabakalı, keratinize edici epitel, canlı epidermisin kalınlığı (~70 um), dermiste kollajen lif düzenlemesi bakımından insan derisi ile benzerlik göstermektedir (253). Domuz derisi, homojen numunelerin alınması için tercih edilen çoklu numune ekstraksiyonu için yeterince geniş bir deri yüzeyine sahiptir ve hayvanın boyutu açısından pratiktir. Bu nedenle, domuz derisi (dermatom veya tam kalınlık), transdermal ilaç taşıyıcı sistemlerin deri geçirgenliğini değerlendirmede rutin olarak kullanılmaktadır. Şekil 2-18'de domuz ve insan derisinin histolojik görüntüleri karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir (249-253).



Şekil 2-18: (A) Domuz ve (B) insan derisinin karşılaştırmalı histolojik görüntüsü (*Hematoksilen-Eozin boyama)* **(252)**

KF: Kıl folikülü, YB: Yağ bezi, TB: Ter bezi, Ad: Adipoz doku, Kas: Erektör *pili* kası

İlaçların geçirgenliğini belirlemek için yeniden yapılandırılmış insan derisi eşdeğerleri de kullanılmaktadır. Deri eşdeğerleri, yapay olarak kültürlenmiş insan derisi modelleri, paralel yapay membran geçirgenlik deneyleri (PAMPA'lar) ve basit polimerik veya lipid modellerine dayalı yapay membranlardır. Keratinositler ve fibroblastlar gibi insan derisi bileşenlerinin kültürlenmesiyle hazırlanırlar. Bu membranlarda, in vitro permeasyon çalışması, insan in vivo koşullarında meydana gelen metabolizma, dağılım ve atılım gibi bileşenleri içermediğinden başarısız olur. Yine de deri eşdeğerleri, tutarlı, tekrarlanabilir geçirgenlik verileri sağlama açısından avantajlıdır. Bu tür modeller, mitotik ve metabolik olarak aktif olan canlı hücrelere sahiptir. Şu anda, EpiDerm™, EpiSkin™ ve Labskin™ gibi pazarlanan çeşitli cilt modelleri bulunmaktadır (249, 250). Bununla birlikte, bu modeller, insan derisine kıyasla ilaç moleküllerinin daha yüksek nüfuz ettiğini göstermiştir. Bu modeller çoğunlukla tahriş ve toksisite testleri için kullanılır. Çok katmanlı polyester sülfondan oluşan Strat-M™ (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts, ABD), sentetik membranlara yeni eklenen bir üründür. İnsan derisi gibi, Strat-M™ membranı da çeşitli yayılma özelliğine sahip çoklu katmanlara sahiptir. İnsan derisinden geçiş için hız sınırlayıcı katman en dıştaki epidermal

katmandır, oysa suni membranlarda hız sınırlayıcı katman açık değildir. Her katmanda hapsolmuş ilacı incelemek için Strat-M™ zarının katmanlarını ayırmak zordur. Ayrıca, yapay membranların kullanımı, formülasyon bileşenlerinin deri ile etkileşimi hakkında kesin bir fikir sağlayamaz. Geçirgenlik değerlerinin ve emilen ilaçların yüzdelerinin belirlenmesi için deri eşdeğerlerine güvenilebilir. Bununla birlikte deri eşdeğerleri, farklı cilt katmanlarına nüfuz eden ilaç miktarını veya emilen dozların yüzdelerini tahmin edemezler (249). Unhida ve ark., Strat-M™ membran, insan derisi ve tüysüz sıçan derisine 13 farklı kimyasal bileşiğin (152 ile 289 Da arasında moleküler ağırlık (MW) ve -0.9 ile 3.5 arasında lipofilisite) penetrasyonunu karşılaştırmış, Strat-M™'de elde edilen log P değerleri, insan ve sıçan derilerindeki değerlere yakın olmasına rağmen, insan ve sıçan derisi verileri arasında daha iyi bir ilişki gözlemlenmiştir. Böylece sıçan derisinin insan derisine alternatif olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. İn vitro testlerde ilk taramanın deri eşdeğerleri kullanılarak yapılması ve nihai ürünlerin penetrasyon verilerinin elde edilmesi için insan veya hayvan derisi kullanılarak test edilmesi önerilmiştir (255).

2.6. Difüzyon

Moleküllerin katı, sıvı veya gazlardan pasif geçişine difüzyon denir. Difüzyon, moleküllerin yüksek konsantrasyonlu bir bölgeden daha düşük konsantrasyonlu bir bölgeye gerçekleşen hareketi olarak tanımlanır (81).

Herhangi bir aktif maddenin etkisini göstermesi için hedef bölgeye ulaşması gerekir. Maddenin hedeflendiği bölgeye ulaşabilmesi için ise biyolojik zarlardan geçmesi gerekir. İlaç bir üründen salındığında da benzer bir mekanizma gerçekleşir; başka bir deyişle, molekül daha yoğun bir ortamdan daha az yoğun bir ortama yayılmalı veya hareket etmelidir (81).

Sentetik veya canlı olmayan cilt ile in vitro permeasyon testi, esas olarak difüzyona dayalıdır ve Brownian hareketi olarak adlandırılan moleküllerin rastgele hareketine dayanır. Bir maddenin difüzyonu sıcaklığa bağlıdır. Daha yüksek sıcaklık, sistemin iç enerjisini artırarak daha etkili Brownian hareketi sağlar. Difüzyon da konsantrasyona bağlıdır. İki sistem arasındaki bir konsantrasyon gradienti, difüzyon oranlarını artıran dengeye doğru bir itici güç sağlar (255).

2.6.1. Fick’in Birinci Kanunu

Fick'in Birinci Yasasına göre, moleküllerin hareketi zarın her iki tarafındaki konsantrasyon farkı "sıfır" olana kadar devam etmelidir (256). Bu durum denklem 2-1 ile ifade edilmektedir:

$$\mathrm{F}=-Dx\left(\frac{dC}{dx}\right) \tag{2-1}$$

dC/dx konsantrasyon gradyanı zamana bağlı değildir. Bu, difüzyonun her birim mesafede çok yoğundan daha az yoğuna geçişi sırasında konsantrasyon farkının zamanla değişmediği anlamına gelir (256).

Fick'in birinci yasasında, D, molekülün difüzyon katsayısı (alan/zaman, cm2/sn); C konsantrasyon (miktar/hacim, g/cm3) ve x molekülün kat ettiği mesafedir(cm). F akıdır; D, molekülün ortam içinde ortama ne kadar alan girip çıkabileceğini gösterir. Yukarıdaki denklemde “-”, moleküler hareketin daha yoğun bölgeden daha az yoğun bölgeye doğru olduğu anlamına gelir. Yoğun bölgeden uzaklaştıkça konsantrasyon azalır ve bu nedenle akı değeri her zaman “+” olacaktır (246).

2.6.2. Fick’in İkinci Kanunu

Fick'in birinci yasasında konsantrasyon ve zaman bağımsız iken, Fick'in ikinci yasasında konsantrasyon ve akış hem zamana hem de mesafeye bağlıdır. Fick’in ikinci yasası aşağıdaki denklem ile ifade edilir:

$$-\frac{dC}{dt} = D\frac{d2j}{dx} \tag{2-2}$$

Denklem 2-2'de akı, zaman ve mesafenin bir fonksiyonudur. Bu denklem sadece tek yönlüdür. Zamanla konsantrasyondaki değişiklik, kat edilen mesafenin konsantrasyon farkının değişim hızına oranıdır (256).

2.6.3. Difüzyonda Denge Durumu

Difüzyondaki denge durumunu yorumlamak için, difüzyon hücrelerinin iki kompartımanı arasında zardan difüzlenen molekülün konsantrasyonundaki değişimi gözlemlemek gerekir. Difüzyon kararlı duruma ulaşana kadar bir gecikme süresi vardır. Gecikme süresi boyunca, verici fazdan alıcı faza difüze olan materyalinin miktarı aynı değildir. Bunun nedeni, zarın verici taraftan zara hareketini ayıran zarın, daha sonra zar içinde hareket etmesi ve zardan alıcı tarafa hareketin difüzyonun toplam süreci olmasıdır. Her bir ortamda, itici güçler, verici ve zar arasındaki, zarın her iki tarafı ile zar ve reseptör çözeltisi arasındaki konsantrasyon gradyanlarından kaynaklanır. Membran içindeki konsantrasyon gradyanı sıfır olduğunda, birim zamandaki difüzyon ve birim alan sabit hale gelir. Bu, kararlı durum difüzyonunu temsil eder (256).

Difüzyon deneylerinde, incelenen madde çözücüde çözündürülüp hücrenin bir tarafına, çözücü ise diğer tarafa konur. İlaç molekülleri derişim farkında göre hücrenin bir tarafından diğer tarafına doğru aradaki membranın içinden geçerek ilerlerler. Franz difüzyon hücresi deneyleri sırasında, alıcı kompartmandaki çözelti belli bir hızda yerine saf çözücü eklenerek yenilenir. Bu şekilde, alıcı kompartmandaki madde konsantrasyonu donör kompartmandaki derişime göre %10 ila 15 kadar daha düşük kalır. Bu durum “sink koşul” olarak anlandırılır (249, 256, 257). Zamanla bir odadan diğerine geçen moleküllerin donör odadaki konsantrasyonu azalır, reseptör odadaki konsantrasyonu artar. Belirli bir zamandan sonra ise alıcı oda ve verici odalardaki çözeltilerin derişimleri eşitlenmese de derişim değişimi durur yani dC/dt sıfıra eşitlenir. Zar içerisindeki molekül değişimi de sıfır olur. Bu durumda akı değer sabitlenir. Bu duruma denge durumu denmektedir (256).

Denge durumunun sağlanması için membranın ilaç molekülleriyle doygun hale gelmesi gerekmektedir. Denge durumuna kadar membrandan difüze olan ilaç miktarı ile zaman arasında doğrusal bir ilişki olmaz. Bu duruma denge durumu öncesi adı verilir. Denge durumunun sağlanmasının ardından difüzyon hızı sabit olur ve sabit akı değeri elde edilir (256, 257).

2.7. İlaç Salım Kinetiği

İlaç salım profili için, ilaç salım kinetiğinin tahmin edilmesi gerekir. Maddelerin fizikokimyasal özellikleri, yardımcı maddeler, dozaj formu tasarımı, üretim süreci değişkenleri ve tasarım gibi çeşitli faktörler, ilacın dozaj formundan salınmasını etkiler. İlaç taşıyıcı sistemlerin salım davranışını tahmin etmek için birçok matematiksel model kullanılmıştır. İlacın salım davranışı, bu matematiksel modellere uyumuna göre belirlenir. İlaç salımı için, korelasyon katsayısının (R^2) en yüksek olduğu model en uygun model olarak seçilir (258).

2.7.1. Sıfırıncı Dereceden Kinetik

Sıfırıncı dereceden kinetik modeli, ilacın konsantrasyondan bağımsız olarak ilaç taşıyıcı sistemden sürekli ilaç salınımını ifade eder. Çözünmüş ilacın fraksiyonunun zamana göre grafiksel gösterimi doğrusaldır. Eğrinin eğimi sıfır dereceli salım kinetiğinde K değerini verir (259). Sıfırıncı dereceden kinetik modeli, Denklem 2-3'te ifade edilmiştir (259).

$$Q_T = Q_0 + K_0 t$$

(2-3) (259)

Denklemde K_0 sıfırıncı derece kinetiğin orantı sabitini, Q_0 ilacın ilk miktarını, Q_t ise t zamanında ilacın salım miktarını temsil etmektedir.

2.7.2. Birinci Dereceden Kinetik

Birinci dereceden kinetik, salım hızının konsantrasyona bağlı olduğu salımı tanımlar. Denklem 2-4'te ifade edilmiştir (259).

$$dC/dt = -Kt$$

(2-4)(259)

Bu denklemin yeniden düzenlenmesi ile Denklem 2-5 elde edilir (259).

$$\log Q_t = \log Q_0 + Kt / 2{,}303$$

(2-5)(259)

Denklemde K birinci dereceden kinetik sabitini, Q_0 ilacın ilk miktarını, t zamanı ifade etmektedir.

Elde edilen veriler ilacın kümülatif log yüzdesi olarak grafiğe geçirilir. Kalan süreye karşı -K/2,303 eğime sahip düz bir çizgi elde edilir. X ekseninde geçen süre ile y ekseninde salınacak kalan ilacın log kümülatif yüzdesi arasında bir grafik çizilir ve girefik düz bir çizgi verir (260).

2.7.3. Higuchi Kinetiği

Bir matris sisteminden ilaç salımını tanımlamayı amaçlayan matematiksel model, 1963 yılında Higuchi tarafından önerilmiştir. Bu modelde ilaç salımı, Fick Yasası'na dayanır. İlaç salımı, karekök zamana bağlı olan bir difüzyon süreci olarak tanımlanır (260).

Bu model, matristeki başlangıç ilaç konsantrasyonunun ilaç çözünürlüğünden çok daha yüksek olduğu, ilaç difüzyonunun yalnızca tek bir boyutta gerçekleştiği, ilaç difüzyonunun sabit olduğu ve salım ortamında sink koşulunun sağlandığı hipotezlerine dayanmaktadır. Higuchi kinetik modeli Denklem 2-6'da ifade edilmiştir (260, 261).

$$Q = K_H * t^{½}$$

(2-6) (261)

Bu denklemde, K_H Higuchi salım sabiti, Q ise toplam ilaç salım miktarıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Badem yağı (Sigma-Aldrich)

Balmumu (Sigma-Aldrich)

Boraks (Sigma-Aldrich)

Disodyum fosfat (Sigma-Aldrich)

DPPC (Sigma-Aldrich)

Etanol (Sigma-Aldrich)

Kloroform (Sigma-Aldrich)

Kolesterol (Sigma-Aldrich)

Metanol (Sigma-Aldrich)

Monosodyum fosfat (Sigma-Aldrich)

Parafin (Sigma-Aldrich)

Potasyum klorür (Sigma-Aldrich)

Sodyum klorür (Sigma-Aldrich)

Soya fosfatidilkolin (Sigma-Aldrich)

Spermaceti (Sigma-Aldrich)

Transresveratrol (Sigma-Aldrich)

Vitamin E (Sigma-Aldrich)

MTT solüsyonu (Sigma-Aldrich)

DPPH çözeltisi (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

3.1.2.1. Kullanılan Aletler

Shimadzu, SIL-20AC Ht Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

Insertil, ODS-3V 250 x 4.60 mm 3 µm Kolon

Malvern Zetasizer-Nano ZS Partikül Büyüklüğü Ölçüm Cihazı

PureLab Distile Su Cihazı

AND GR-200 Hassas Terazi

WTW pH 3110 pH Metre (WTW, Almanya)

Wise Stir® Manyetik karıştırıcı

PermeGear V6- CB- 02 Manyetik Karıştırıcılı Franz Difüzyon Sistemi

WiseClean® Ultrasonik banyo

Allegra X-30R santrifüj (Beckman Coulter, ABD)

Wisebath Çalkalamalı su banyosu

Carl Zeiss EVO40 Taramalı Elektron Mikroskobu

Nüve İklimlendirme kabini

3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler

Cam Malzemeler (Erlen, Beher, Pipet, Balon joje, Mezür, Cam şişe, vb.)

HPLC Vialleri

Eppendörf

Zetasizer Küveti

Domuz derisi

Parafilm®

Şırınga ucu filtreler (Sartarius Minisart RC)

Membran Filtre (Sartorius Stedium Biotech)

3.2. Yöntem

3.2.1. Resveratrolün Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Resveratrolün miktar tayini için HPLC analizi kullanıldı. HPLC yöntemi, hazırlanan lipozomlarda in vitro Franz difüzyon hücresi geçiş çalışmalarında, stabilite çalışmalarında kullanıldı.

Kullanılan HPLC ekipmanı Shimadzu SIL-20AC Ht HPLC otomatik örnekleyici ve pompadan oluşuyordu. Bu analiz için Inertsil ODS-3V 250 x 4.60 mm 3 µm kolon kullanıldı.

HPLC analizlerine başlamadan önce resveratrol için UV spektrofotometrede, 1 cm'lik kuvartz küvetler kullanarak 200 - 500 nm arasında dalga boyu taraması yapıldı.

3.2.2. Resveratrolün HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Validasyon, kullanılan yöntemin devamlı doğru ve güvenilir bir şekilde beklenen sonuçları verdiğinin kanıtlanması için yapılan işlemler bütünüdür. Validasyon işlemleri ile yöntemin geçerliliği ve güvenirliği kanıtlanmış olur (262).

Tablo 3-1'te HPLC yönteminin koşulları verilmiştir.

Tablo 3-1: Resveratrolün HPLC ile miktar tayini koşulları

Kolon	Inertsil ODS-3V 250 x 4.60 mm 3 µm
Akış Hızı	0.9 ml/dakika
Dalga Boyu	306 nm
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 µl
Oto Örnekleyici Sıcaklığı	25 °C
Enjeksiyon Süresi	15 dakika
Seyreltme çözeltisi	Metanol: Su (50:50)
Hareketli faz çözeltisi	Metanol: Su (51:49)

Metanol:su karışımında (50:50, v/v) 1 mg/mL'lik resveratrol stok standart çözeltisi ve ardından farklı konsantrasyonda sekiz standart çözelti (0.001, 0.007, 0.01, 0.012, 0.016, 0.020, 0.024, 0.040 mg/ml) hazırlandı. Saptama sınırını (LOQ) ve duyarlılık sınırını (LOD) belirlemek için sekiz standart çözelti (0.001, 0.007, 0.01, 0.012, 0.016, 0.020, 0.024, 0.040 mg/ml) hazırlandı. Enjeksiyondan önce standartlar ve numuneler 0,22 µm gözenek boyutlu bir filtreden (Millipore, Bedford, ABD) süzüldü.

Kromatografik analizler, 0.9 mL/dk'lık bir akış hızında pompalanan bir metanol ve su karışımından (51:49, v/v) oluşan bir mobil faz ile izokratik modda gerçekleştirilmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 20 µL ve dalga boyu 306 nm'ye ayarlandı. Enjeksiyon süresi, 25°C sıcaklıkta 15 dakikadır.

Bu amaçla, validasyon çalışması yapılmış ve doğrusallık, doğruluk ve geri kazanım, kesinlik, özgünlük ve seçicilik, duyarlılık ve saptama sınırı parametreleri incelenmiştir.

3.2.2.1. Doğrusallık

Hazırlanan numunedeki etkin madde miktarının belli bir aralığı içerisindeki derişimi ile elde edilen yanıtın orantılı olduğunun ifadesidir (268).

Resveratrolün 50:50 (h/h) metanol:su karışımında 0.001, 0.007, 0.01, 0.012, 0.016, 0.020, 0.024, 0.040 mg/ml konsantrasyonlarındaki sekiz ayrı çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Resveratrol derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi.

Doğrusallık, en küçük kareler yöntemi kullanılarak aşağıdaki regresyon denklemi (3-1) ve korelasyon katsayısı (r) hesaplanarak sekiz konsantrasyon seviyesinde (0.001 – 0.040 mg/ml) değerlendirildi:

Y =146268045,8806x - 7886,8289 **(3-1)**

r = 0,9999

Burada Y tepe alanıdır ve x, mg/mL cinsinden standart çözelti konsantrasyonudur. 1'e yakın bir r değeri, önerilen aralıktaki doğrusallığı göstermektedir.

3.2.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım

Doğruluk, saptanan madde miktarının numune içerisindeki gerçek etkin madde miktarına yakınlığıdır. Geri elde yüzdesi, yöntemin doğruluğunu ifade eder. %95 olasılıkla daha önceden kabul edilen ölçütler arasında kalmalıdır (268).

Resveratrolün hem çözeltiden hem de lipozomlardan kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Geri elde edilen miktarlar hesaplanarak, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.2.3. Kesinlik

Bir analitik yöntemin kesinliği, aynı konsantrasyondaki numunenin seçilen metotla birbiri ardına yapılan ölçümlerinin birbirine yakınlığı ile değerlendirilir. Kesinlik ise tekrar edilebilirliğinin göstergesidir. Standart sapma, bağıl sapma ve varyasyon katsayısı değerleri yardımıyla kesinlik değerlendirilir (268).

Deney içi kesinlik için resveratrolün kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 6 kere enjekte edildi.

Elde edilen pik alanlarının ortalaması, standart sapması ve bağıl sapması hesaplandı.

Deneyler arası tekrarlanabilirlik için, resveratrolün 0.01, 0.025, 0.05 mg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.2.4. Özgünlük ve Seçicilik

Seçilen metodun sadece amaçlanan analiti ayırt edebilme yeteneğidir. Kullanılan analiz yöntemi sadece analiz etmek istenilen maddeyi saptamalıdır. Numune içinde var olan diğer maddelerin aynı dalga boyunda saptanıp saptanmadığının kontrolünün yapılması gerekmektedir.

Etken madde içermeyen, yalnızca resveratrol içeren, hem resveratrol hem diğer lipozom bileşenleri içeren çözeltiler hazırlanarak analiz sonuçlarının karşılaştırılması yapıldı. Ayrıca kullanılan mobil faz enjekte edilerek analiz sonuçları elde edildi.

3.2.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Kullanılan analiz yönteminin güvenilir bir şekilde analiz edebildiği en düşük derişimi belirlemek amacıyla yapılan işlemlerdir. Duyarlılık (3-2) ve saptama
sınırı (3-3) aşağıdaki denklemlerle hesaplanır (268).

Duyarlık sınırı (LOD) = (3.3 x σ) / S **(3-2)**

Saptama sınırı (LOQ) = (10 x σ) / S **(3-3)**

σ : kalibrasyon aralığındaki en düşük derişimin standart sapması

S : kalibrasyon eğrisinin eğimi

3.2.3. Resveratrol Çözünürlük Testi

Resveratrolün in vitro çalışmalarda kullanılacak olan reseptör çözeltisi içindeki çözünürlüğünü hesaplamak için, resveratrolün PBS çözeltisi ve HCO-60:ethanol:PBS (2:20:78, h/h/h) çözeltisi hazırlandı. 30 ml çözelti içinde 1 g aktif bileşen, bir manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca 25°C'de 150 rpm'de karıştırıldı. Üç paralel çözünürlük çalışması yapıldı. Numuneler 0,22 µm gözenek boyutlu bir filtreden süzülerek 1 ml numune alındı, numuneler 3.2.2 yöntemi ile analiz edildi.

3.2.4. Koenzim Q10'un Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Koenzim Q10'un miktar tayini için HPLC analizi kullanıldı. HPLC yöntemi, hazırlanan lipozomlarda in vitro Franz difüzyon hücresi geçiş çalışmalarında, stabilite çalışmalarında kullanıldı.

Kullanılan HPLC ekipmanı Shimadzu SIL-20AC Ht HPLC otomatik örnekleyici ve pompadan olmaktadır. Bu analiz için Hypersil GOLD (250 x 4.60 mm 5 µm) kolon kullanıldı.

HPLC analizlerine başlamadan önce koenzim Q10 için UV spektrofotometrede, 1 cm'lik kuvartz küvetler kullanarak 200 - 400 nm arasında dalga boyu taraması yapıldı.

3.2.5. Koenzim Q10'un HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Tablo 3-2'te HPLC yönteminin koşulları verilmiştir.

Tablo 3-2: Koenzim Q10'un HPLC ile miktar tayini koşulları

Kolon	Hypersil GOLD 250 x 4.60 mm 5 µm
Akış Hızı	1 ml/dakika
Dalga Boyu	275 nm
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Hacmi	10 µl
Oto Örnekleyici Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Süresi	10 dakika
Seyreltme çözeltisi	Metanol: n-Hekzan (80:20)
Hareketli faz çözeltisi	Metanol: n-Hekzan (80:20)

Metanol:n-Hekzan karışımında (80:20, v/v) 1 mg/mL'lik koenzim Q10 stok standart çözeltisi ve ardından yedi standart çözelti (0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL) hazırlandı. Saptama sınırını (LOQ) ve duyarlılık sınırını (LOD) belirlemek için yedi standart çözelti (0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL) hazırlandı. Enjeksiyondan önce standartlar ve numuneler 0.22 µm gözenek boyutlu bir filtreden (Millipore, Bedford, ABD) süzüldü.

Kromatografik analizler, 1 mL/dk'lık bir akış hızında pompalanan bir metanol ve n-hekzan (80:20 h/h) karışımından oluşan bir mobil faz ile izokratik modda gerçekleştirilmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 10 µL ve dalga boyu 275 nm'ye ayarlandı. Enjeksiyon süresi, 25°C sıcaklıkta 10 dakikadır.

3.2.5.1. Doğrusallık

Doğrusallık için, koenzim Q10'un kalibrasyon eğrisi hazırlanmış, korelasyon katsayısı ve doğrusallık belirlenmiştir.

Koenzim Q10'un 80:20 (h/h) metanol: n-Hekzan karışımında 0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL konsantrasyonlarındaki yedi ayrı çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Koenzim Q10 derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi.

Doğrusallık, en küçük kareler yöntemi kullanılarak bölüm 3.2.2.1.'de belirtildiği şekilde hesaplanarak yedi konsantrasyon seviyesinde (0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL) değerlendirildi.

3.2.5.2. Doğruluk ve Geri Kazanım

Koenzim Q10'un hem çözeltiden hem de lipozomlardan kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Geri kazanılan miktarlar hesaplanarak, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.5.3. Kesinlik

Deney içi kesinlik için koenzim Q10'un kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 6 kere enjekte edildi.

Elde edilen pik alanlarının ortalaması, standart sapması ve bağıl sapması hesaplandı.

Tekrarlanabilirlik için, koenzim Q10'un 0.015, 0.03, 0.15 mg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.5.4. Özgünlük ve Seçicilik

Etken madde içermeyen, yalnızca koenzim Q10 içeren, hem koenzim Q10 hem diğer lipozom bileşenleri içeren çözeltiler hazırlanarak analiz sonuçlarının karşılaştırılması yapıldı. Ayrıca kullanılan mobil faz enjekte edilerek analiz sonuçları elde edildi.

3.2.5.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Duyarlılık ve saptama sınırı Bölüm 3.2.2.5' te belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

3.2.6. Koenzim Q10 Çözünürlük Testi

Koenzim Q10'un in vitro çalışmalarda kullanılacak olan reseptör çözeltisi içindeki çözünürlüğünü hesaplamak için, koenzim Q10'un PBS çözeltisi ve HCO-60:ethanol:PBS (2:20:78, h/h/h) çözeltisi hazırlandı. 30 ml çözelti içinde 1 g aktif bileşen, bir manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca 25°C'de 150 rpm'de karıştırıldı. Üç paralel çözünürlük çalışması yapıldı. Numuneler 0,22 µm gözenek boyutlu bir filtreden süzülerek 1 ml numune alındı, numuneler 3.2.4 yöntemi ile analiz edildi.

3.2.7. Vitamin E'nin Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Vitamin E'nin miktar tayini için HPLC analizi kullanıldı. HPLC yöntemi, hazırlanan lipozomlarda in vitro Franz difüzyon hücresi geçiş çalışmalarında, stabilite çalışmalarında kullanıldı.

Kullanılan HPLC ekipmanı Shimadzu SIL-20AC Ht HPLC otomatik örnekleyici ve pompadan oluşmaktadır. Bu analiz için Hypersil GOLD (250 x 4.60 mm 5 µm) kolon kullanıldı.

HPLC analizlerine başlamadan önce vitamin E için UV spektrofotometrede, 1 cm'lik kuvartz küvetler kullanarak 240 - 340 nm arasında dalga boyu taraması yapıldı.

3.2.8. Vitamin E'nin HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Tablo 3-3'te HPLC yönteminin koşulları verilmiştir.

Tablo 3-3: Vitamin E'nin HPLC ile miktar tayini koşulları

Kolon	Hypersil GOLD 250 x 4.60 mm 5 µm
Akış Hızı	1 ml/dakika
Dalga Boyu	275 nm
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Hacmi	10 µl
Oto Örnekleyici Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Süresi	10 dakika
Seyreltme çözeltisi	Metanol: n-Hekzan (80:20)
Hareketli faz çözeltisi	Metanol: n-Hekzan (80:20)

Metanol:n-Hekzan karışımında (80:20, v/v) 1 mg/mL'lik vitamin E stok standart çözeltisi ve ardından yedi standart çözelti (0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL) hazırlandı. Saptama sınırını (LOQ) ve duyarlılık sınırını (LOD) belirlemek için yedi standart çözelti (0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL) hazırlandı. Enjeksiyondan önce standartlar ve numuneler 0.22 µm gözenek boyutlu bir filtreden süzüldü.

Kromatografik analizler, 1 mL/dk'lık bir akış hızında pompalanan bir metanol ve n-hekzan (80:20 h/h) karışımından oluşan bir mobil faz ile izokratik modda gerçekleştirilmiştir. Numune enjeksiyon hacmi 10 µL ve dalga boyu 275 nm'ye ayarlandı. Enjeksiyon süresi, 25°C sıcaklıkta 10 dakikadır.

3.2.8.1. Doğrusallık

Doğrusallık için, vitamin E'nin kalibrasyon eğrisi hazırlanmış, korelasyon katsayısı ve doğrusallık belirlenmiştir.

Vitamin E'nin 80:20 (h/h) metanol: n-hekzan karışımında 0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL konsantrasyonlarındaki yedi ayrı çözeltisi hazırlandı ve HPLC'ye enjekte edildi. Pik alanları bulundu. Vitamin E

derişimlerine karşılık elde edilen pik alanlarına doğrusal en küçük kareler yöntemi uygulandı. Standart doğru denklemi elde edildi.

Doğrusallık, en küçük kareler yöntemi kullanılarak bölüm 3.2.2.1' de belirtildiği şekilde hesaplanarak yedi konsantrasyon seviyesinde (0.003, 0.015, 0.03, 0.075, 0.15, 0.30, 0.60 mg/mL) değerlendirildi.

3.2.8.2. Doğruluk ve Geri Kazanım

Vitamin E'nin hem çözeltiden hem de lipozomlardan kalibrasyon denklemi kullanılarak geri elde edilen miktarları hesaplandı.

Geri elde edilen miktarlar hesaplanarak, gerekli istatistiksel parametrelerle değerlendirildi.

3.2.8.3. Kesinlik

Deney içi kesinlik için Vitamin E'nin kalibrasyon doğru denklemini oluşturmak için stok çözeltisinden uygun seyreltmeler yapılarak hazırlanan çeşitli derişimdeki çözeltilerin, herhangi bir derişimde olan örneklerinden biri HPLC'ye ardı ardına 6 kere enjekte edildi.

Elde edilen pik alanlarının ortalaması, standart sapması ve bağıl sapması hesaplandı.

Tekrarlanabilirlik için, Vitamin E'nin 0.01, 0.025, 0.05 mg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlandı. Bu numuneler birbirini takip eden 3 gün içerisinde 3'er kez HPLC'ye enjekte edildi. Elde edilen pik alanlarına karşılık gelen derişimlerin ortalaması, standart sapması ve varyasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.8.4. Özgünlük ve Seçicilik

Etken madde içermeyen, yalnızca vitamin E içeren, hem vitamin E hem diğer lipozom bileşenleri içeren çözeltiler hazırlanarak analiz sonuçlarının karşılaştırılması yapıldı. Ayrıca kullanılan mobil faz enjekte edilerek analiz sonuçları elde edildi.

3.2.8.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Duyarlılık ve saptama sınırı Bölüm 3.2.2.5' te belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

3.2.9. Vitamin E Çözünürlük Testi

Vitamin E'nin in vitro çalışmalarda kullanılacak olan reseptör çözeltisi içindeki çözünürlüğünü hesaplamak için, vitamin E'nin PBS çözeltisi ve HCO-60:ethanol:PBS (2:20:78, h/h/h) çözeltisi hazırlandı. 30 ml çözelti içinde 1 g aktif bileşen, bir manyetik karıştırıcıda 1 saat boyunca 25°C'de 150 rpm'de karıştırıldı. Üç paralel çözünürlük çalışması yapıldı. Numuneler 0.22µm filtreden süzülerek 1 ml numune alındı, numuneler 3.2.8 yöntemi ile analiz edildi.

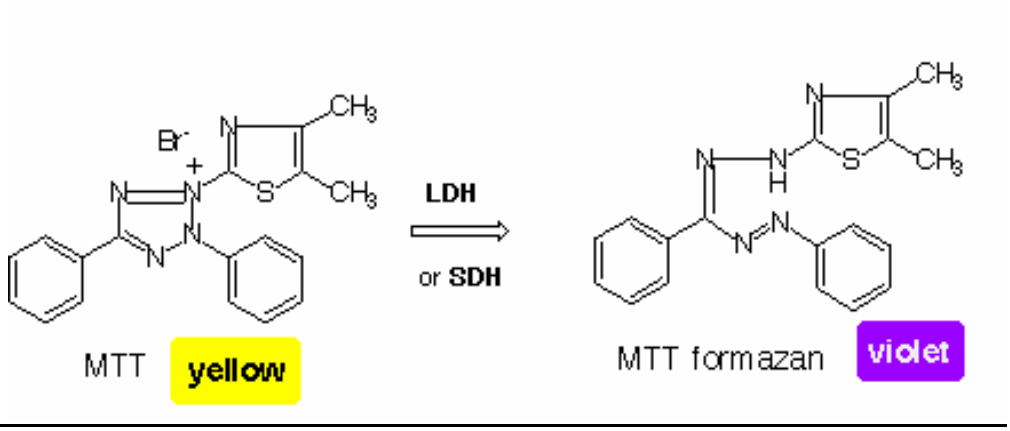
3.2.10. Etken Maddelerin Hücre Kültürü Toksisite Testi

MTT testi, suda çözünür sarı boya MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]'ün mitokondriyal redüktazın etkisiyle çözünmeyen mor bir formazana dönüştürülmesini içerir. Formazan daha sonra çözündürülür ve konsantrasyon 570 nm'de optik yoğunluk ile belirlenir. MTT testi, kuyu başına ~106 hücreye kadar mükemmel doğrusallığa sahip hassas bir testtir (263).

MTT substratı fizyolojik olarak dengeli bir çözelti içinde hazırlanır, kültürdeki hücrelere genellikle 0.2 - 0.5 mg/ml'lik bir konsantrasyonda eklenir ve 1 ila 4 saat inkübe edilir. Formazan miktarı bir plaka okuyucu kullanılarak 570 nm'de absorbanstaki değişiklikler kaydedilerek ölçülür. Boya absorbans miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır (263)

Aktif metabolizmaya sahip canlı hücreler, MTT'yi maksimum 570 nm'ye yakın bir absorbans ile mor renkli bir formazan ürününe dönüştürür (Şekil 3-1). Hücreler öldüğünde, MTT'yi formazana dönüştürme yeteneklerini kaybederler, bu nedenle renk oluşumu sadece canlı hücreler için kullanışlı ve uygun bir işaret görevi görür (263).

MTT tetrazolyumun formazan ürünü, hücre yüzeyinin yakınında ve kültür ortamında birikmenin yanı sıra, hücrelerin içinde çözünmeyen bir çökelti olarak birikir. Formazan, absorbans okumalarını kaydetmeden önce çözündürülmelidir. Formazan ürününü çözündürmek, rengi stabilize etmek ve buharlaşmayı önlemek için asitleştirilmiş izopropanol, DMSO, dimetilformamid, SDS ve deterjan ve organik çözücü kombinasyonları kullanılabilir (263).



Şekil 3-1: MTT reaksiyonunun kimyasal gösterimi (263)

Testte L-929 (fare fibroblast hücreleri) hücrelerinin canlılıkları 24 saat izlendi.

Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E için MTT testi uygulandı. Amaç, hücrelerden geçiş çalışmasını yapacağımız formülasyonları oluşturan etkin ve yardımcı maddeleri, hücreler canlı kalacak şekilde, maksimum hangi miktarlarda kullanabileceğinin görülmesidir. Lipozomda kullanılacak lipitlerin hücrelere etkisini görmek için etken madde içermeyen, sadece soya lesitini ve kolesterolden oluşan lipozomlar hazırlandı ve MTT testine tabi tutuldu.

Test numuneleri: Lipozomlar ve aktif maddeler (Resveratrol, koenzim Q10, vitamin E) DMEM ile %10, %5, %1 ve %0.1 konsantrasyonlarında seyreltildi.

Numuneler, 0.22 µm'lik tek kullanımlık membran filtrelerden süzüldü. Deney yapılıncaya kadar +4ºC'de saklandı. Test için 37ºC'ye getirildikten sonra kullanıldı.

Hücreler kültür kaplarında (96 kuyucuklu) üretildi. Her bir kuyucuğa 100 µL DMEM eklenerek kuyucuklar 24 saat 37ºC'de karbondioksitli etüvde bekletildi. Her grup hücre için sadece DMEM içeren (başka hiçbir madde içermeyen) kontrol grupları hazırlandı. Daha sonra kaplar boşaltıldı. Farklı konsantrasyonlarda test maddelerinin DMEM içerisindeki 100 µL çözeltileri kuyucuklara eklendi ve 37ºC'de CO_2'li etüvde 24 saat boyunca bekletildi. 24 saatin sonunda kapların içeriği boşaltıldı. Tüm kuyucuklara taze DMEM (100 µL) ve

MTT çözeltisi (13 µL) eklendi. Kültür kapları aluminyum folyoyla sarıldı. 37ºC'de 3 saat CO_2'li etüvde bekletildi. 3 saatin ardından kaplar etüvden çıkarılıp boşaltıldı. kuyucuklara DMSO (100'er µL) eklendi. Oluşan mor renk spektrofotometrik olarak 570 nm'de görüldü. Ardından 450 nm'de hücrelerin absorbansı mikroplaka okuyucu (Biorad-iMark) yardımıyla ölçüldü. Absorbans değerlerinden hareketle farklı derişimlerde canlı hücrelerin oranı tayin edildi. Bu değerlerden hareketle % canlılık hesapları yapıldı.

Sitotoksisite analizinin tamamı üç kopya şeklinde gerçekleştirildi. Her konsantrasyon için hücreler dört ayrı kuyuya ekildi. Testin güvenirliliğini arttırmak adına kuyu başına üç okuma yapıldı. Hücre canlılığı Denklem 3-4 ile hesaplandı.

$$\% \text{ Canlılık} = [(\text{Absorbans}_{\text{Örnek}} * 100) / \text{Absorbans}_{\text{Hücre kontrol}}]$$

(3-4)(269)

3.2.11. İn vitro Çalışmalarda Kullanılan Formülasyonlar

İn vitro geçiş çalışmalarında 5 farklı formülasyon kullanıldı. Formülasyon içeriklerinde kullanılacak resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E miktarları MTT testi sonuçları göz önüne alınarak belirlendi. Geçiş çalışmalarında kullanılan formülasyonlar:

a. Resveratrol içeren lipozom (RSV-Lipo)

b. Koenzim Q10 içeren lipozom (CoQ10-Lipo)

c. Vitamin E içeren lipozom (VitE-Lipo)

d. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren lipozom (RSV-CoQ10-VitE-Lipo)

e. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren konvansiyonel krem (RSV-CoQ10-VitE-Krem)

3.2.12. İn vitro Çalışmalarda Kullanılan Formülasyonların Hazırlanması

Tez çalışmasında, Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren lipozomlar kullanıldı. Lipozomlar, fosfolipit olarak soya lesitini ve stabilite artırıcı olarak kolesterol kullanılarak Bangham film yöntemi hazırlandı.

3.2.13. Aktif madde içermeyen lipozomların hazırlanması

Lipozom hazırlanmasında; lesitin, lipozomlarda en yaygın olarak uygulanan fosfolipid olması, doğal olması, nötr yüklü olması, inert bir madde olması ve ekonomik olması nedeniyle tercih edilmiştir.

Lipozom hazırlanırken kullanılan daha yüksek fosfolipid konsantrasyonu, daha fazla vezikül oluşmasını, böylece daha fazla etken madde tutulmasını sağlamaktadır. Ancak lesitin konsantrasyonu çok yüksekse, kapsülleme verimliliği azalabilmektedir. Bunun için en uygun lesitin – kolesterol konsantrasyonunu belirlemek önemlidir (216).

En uygun formülasyonun belirlenmesi için farklı soya lesitini: kolesterol konsantrasyonlarına sahip boş lipozom formülasyonları ince film hidratasyon yöntemiyle aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Soya lesitini ve kolesterol, kloform-metanol (2:1) karışımı içinde cam balonda çözündürüldü. Ardından organik çözücüler, balonun duvarında muntazam, ince bir lipid filmi elde etmek için 44^{o}C'de vakum buharlaştırıcı (Rotavapor-R, W. Büchi, Flawil Schweiz) ile ortamdan uzaklaştırıldı. Biriken lipit filmi, uygun hacimde su (çift damıtılmış) ile hidrate edildi. Süspansiyon, vorteks ile 5 dk çalkalandı ve sonra 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. Ardından vezikül boyutunu küçültmek için 10 dk prob sonikatörle sonikasyona tabi tutuldu. Son olarak, hazırlanan lipozomal dispersiyonlar, herhangi bir yapısal kusuru engellemek için oda sıcaklığında saklandı.

Hazırlanan boş lipozomlar partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli açısından değerlendirildi. Analiz sonuçlarına göre belirlenen en uygun soya lesitini: kolesterol konsantrasyonuna sahip lipozom formülasyonu tekrar aynı yöntemle hazırlanarak sonuçların tutarlılığı kontrol edildi.

En uygun soya lesitini: kolesterol konsantrasyonu seçildikten sonra, aktif maddelerin enkapsülasyon çalışmaları için lipozomlar hazırlandı.

3.2.13.1. Resveratrol içeren Lipozom Hazırlanması

Lipozomlar, fosfolipit olarak soya lesitini, stabilite artırıcı olarak kolesterol kullanılarak Bangham film yöntemi ile hazırlandı. Soya lesitini: kolesterol armut tipli cam balona konuldu. Balona aktif madde ilave edildi. Kloform-metanol (2:1) karışımı eklenerek maddelerin çözünmesi sağlandı. 44ºC'de rotavaporda organik çözücüler uçuruldu. Kuru lipit film elde edildi. Elde edilen kuru lipit film uygun hacimde su (çift damıtılmış) ile hidrate edildi. Vorteks ile 5 dk çalkalandı, 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. 10 dk prob sonikatörle sonikasyona tabi tutuldu. Hazırlanan lipozom süspansiyonu, oda sıcaklığında saklandı.

3.2.13.2. Koenzim Q10 içeren Lipozom Hazırlanması

Lipozomlar, aktif madde olarak koenzim Q10 kullanılarak Yöntem 3.2.13.1'deki şekilde hazırlandı.

3.2.13.3. Vitamin E içeren Lipozom Hazırlanması

Lipozomlar, aktif madde olarak vitamin E kullanılarak Yöntem 3.2.13.1'deki şekilde hazırlandı.

3.2.13.4. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren lipozom hazırlanması

Lipozomlar, fosfolipit olarak soya lesitini, stabilite artırıcı olarak kolesterol (Ch) kullanılarak Bangham film yöntemi ile hazırlandı. Etken maddeler lipofilik olduklarından yağ fazına eklendi. Soya lesitini: kolesterol armut tipli cam balona konuldu. Balona resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E ilave edildi. Kloform-metanol (2:1) karışımı eklenerek maddelerin çözünmesi sağlandı. 44ºC'de rotavaporda organik çözücüler uçuruldu. Kuru lipit film elde edildi. Elde edilen kuru lipit film uygun hacimde su (çift damıtılmış) ile hidrate edildi. Vorteks ile 5 dk çalkalandı, 15 dk ultrasonik banyoda bekletildi. 10 dk prob sonikatörle sonikasyona tabi tutuldu. Hazırlanan lipozom süspansiyonu, oda sıcaklığında saklandı.

3.2.13.5. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren Krem Hazırlanması

Etken maddelerin lipozom içerisine kapsüllenmesinin in vitro geçişe etkisini karşılaştırmak amacıyla resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E içeren bir su içinde yağ emülsiyonu hazırlandı.

Tablo 3-4: Krem formülasyonu içeriği

İçerik	% k/h
Resveratrol	1
Koenzim Q10	1
Vitamin E	1
Balmumu	10
Badem yağı	50
Parafin	5
Balık nefsi	5
Boraks	3
Metil paraben	0,1
Distile su	23,9

Balmumu, parafin ve balık nefsi su banyosunda eritildi. Badem yağı ilave edildi ve 70 ºC'ye ısıtıldı. Boraks ve metil paraben suda çözüldü. 70 ºC'ye ısıtıldı. Her iki faz da 70 ºC'ye geldikten sonra sulu faz erimiş yağ fazına karıştırarak yavaşça eklendi. Krem, sürekli karıştırılarak yavaşça soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra etken maddeler eklendi ve iyice karıştırıldı. Etken maddelerin krem içerisinde iyice karışması için formülasyon homojenizatörle 5 dk karıştırıldı.

3.2.14. İn vitro Çalışmalarda Kullanılan Lipozomların Karakterizasyonu

Hazırlanan lipozomların karakterize edilmesi amacıyla, partikül büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, lipozom içine hapsedilen resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E miktarları incelendi.

3.2.14.1. Lipozomların Partikül büyüklüğü, Partikül boyutu Dağılımı ve Zeta potensiyel Analizi

Lipozomların karakterizasyonunda temel kriterlerden biri boyut ve boyut dağılımının belirlenmesidir. Dinamik ışık saçılımı (DLS), lipozom boyutunu, polidispersiteyi ve zeta potansiyelini (yüzey yükü) belirlemek için en yaygın kullanılan yöntemdir. DLS, rutin analizler için basit, hızlı ve güvenilir bir yöntem olmasının yanı sıra, nanometreden mikrometreye çok çeşitli boyutları değerlendirmek dahil olmak üzere birçok avantaj sunar (233).

Polidispersite indeksi, partikül büyüklüğü dağılımlımının bir ölçüsüdür. Kabul edilebilir bir polidispersite indeksi 0,7'nin altında bir değere sahip olmalıdır (264).

Hem boş hem de etken madde yüklü lipozom formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel analizleri bilgisayarlı bir partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçüm cihazı (Malvern Zetasizer-Nano ZS, Malvern, ABD) kullanılarak DLS tekniği ile belirlendi. Ölçümler 25±2°C ve saçılma açısı 90° olarak yapılmıştır. Ortalama değerler, tekrarlanan 3 ölçümün okumalarının ortalaması hesaplanarak belirlendi.

Ölçümler, aletin küvet sisteminde az miktarda lipozomun bidistile su içinde dağıtılmasıyla elde edilen dispersiyon kullanılarak yapıldı.

Hazırlanan lipozomların parçacık büyüklüğü ve dağılımının zamanla ve sıcaklıkla değişip değişmediği stabilite çalışmalarında incelendi.

3.2.14.2. Lipozomların Şekli

Hazırlanan lipozomların şekli taramalı elektron mikroskobu (SEM, Carl Zeiss EVO40) ile gözlendi.

3.2.14.3. Lipozomların pH Ölçümü

Lipozomların pH ölçümleri, bir masaüstü pH metre (WTW pH 3110, WTW, Almanya) kullanılarak yapıldı. Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı ve ortalama değerler ve standart sapma hesaplandı.

3.2.14.4. Lipozomların Kapsülleme Verimliliği Tayini

Lipozomal veziküler sistemlerin kapsülleme verimliliği (EE), ultrasantrifüj yöntemiyle belirlendi. Enkapsülasyon etkinliğini belirlemek için 0.5 ml lipozom, distile su ile seyreltildi ve Allegra X-30R santrifüj (Beckman Coulter, ABD) ile 45 dakika 16.000g hızda santrifüj edildi. Süpernatandan alınan numuneler miktar tayini çalışmalarında kullanıldı. Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E miktarları HPLC ile tayin edildi. Lipozomlar içine hapsedilen T aktif bileşenin toplam miktarı, C sadece süpernatanda tespit edilen aktivite miktarı olmak üzere, lipozomun etken maddeyi tutma kapasitesi Denklem 3-5 ile hesaplandı.

$$\% RE = \frac{T - C}{T} \; x \; 100$$

(3-5) (232)

3.2.15. Lipozomların Hücre Kültürü Toksisite Testi

Sitotoksisite analizi, hücre ekiminden, aktif materyallerin (resveratrol, koenzim Q10, vitamin E) ve yeni geliştirilen resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E yüklü lipozom formülasyonlarının eklenmesi, bu karışımla inkübe edilmesi ve inkübasyonun sonunda MTT solüsyonunun eklenmesinden oluşmaktadır.

Boş ve etkin madde yüklü lipozom formülasyonlarıın sitotoksisite testi Bölüm 3.2.10'da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.2.16. Lipozom Formülasyonlarına Ait Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan lipozomların ölçülen partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyellerinin zamanla değişimini incelemek için farklı üç sıcaklıkta (4^{o}C, 25^{o}C, 40^{o}C) bekletilen formülasyonların 0, 7, 30, 60, 90, 180. günlerde partikül büyüklüğü ve dağılımı ile zeta potansiyelleri ölçüldü.

3.2.17. Lipozom Formülasyonlarında Resveratrol Miktar Tayini

Resveratrol, lipozomlardan Bölüm 3.2.2'de anlatıldığı gibi HPLC yöntemiyle, 0,7,30, 60, 90, 180. günlerde tayin edildi.

3.2.18. Lipozom Formülasyonlarında Koenzim Q10 Miktar Tayini

Koenzim Q10, lipozomlardan Bölüm 3.2.5'te anlatıldığı gibi, HPLC yöntemiyle 0,7,30, 60, 90, 180. günlerde tayin edildi.

3.2.19. Lipozom Formülasyonlarında Vitamin E Miktar Tayini

Vitamin E, lipozomlardan Bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi HPLC yöntemiyle 0,7,30, 60, 90, 180. günlerde tayin edildi.

3.2.20. İn vitro Geçiş Çalışmaları

Lipozomlarda tutulan resveratrol, koenzim Q10, vitamin E'nin in vitro difüzyon testi yarı otomatik Franz difüzyon sistemi (PermeGear V6-CB-02 Franz Cell) kullanılarak yapıldı. Hücrelerin sıcaklığı, 37°C'de sirkülasyonlu bir su banyosu ile sabit tutuldu. Verici ve alıcı hücreler arasında kullanılan membran olarak selüloz asetat (0,45 µm) kullanıldı. Membran örnekleri kullanımdan önce 2 saat reseptör çözeltisinde bekletildi. Reseptör solüsyonu olarak HCO-60:etanol:PBS (2:20:78, h/h/h) çözeltisi kullanıldı.

Geçiş çalışması, verici ve alıcı hücreler arasında membran olarak domuz derisi kullanılarak aynı koşullarda tekrar gerçekleştirildi. Domuz derisi ile gerçekleştirilen in vitro geçiş çalışmalarında Franz difüzyon hücreleri kullanıldı. Domuz derisi, insan derisine benzer özellikler gösterdiği için tercih edilmiştir. Domuz derisi, 30-140 µm epidermis kalınlığına sahip olduğundan, 50-120 µm kalınlığına sahip insan epidermisi yerine geçiş çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (249). Çalışmada kullanılan domuz derileri bir kesim evinden tedarik edilmiştir. Alınan deri ilk olarak soğuk su ile yıkandı, ardından yağ tabakaları temizlendi. Daha sonra deri yaklaşık 800 µm kalınlığında düzgün parçalara ayrıldı. -70°C'de muhafaza edildi. Kullanmadan önce dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığında bir süre bekletildi, ardından 30 dakika reseptör çözeltisi içerisinde bekletildi, Franz difüzyon hücrelerine yerleştirildi. Difüzyon hücrelerine yerleştirilen deri parçalarının stratum corneum bölümünün üstte kalmasına ve yerleştirilirken arada hava boşluğu kalmamasına dikkat edildi. Deriler hücrelere yerleştirildikten sonra dışarıda kalan bölümler kesildi. Su banyosu 37°C'ye ayarlandı. Sistemde denge sağlanması amacıyla 30 dakika beklendi. Aktif bileşenlerin membrandan salımı incelendi. Hücrenin reseptör kısmının hacmi 11 ml idi ve reseptör solüsyonu bir manyetik karıştırma çubuğu ile

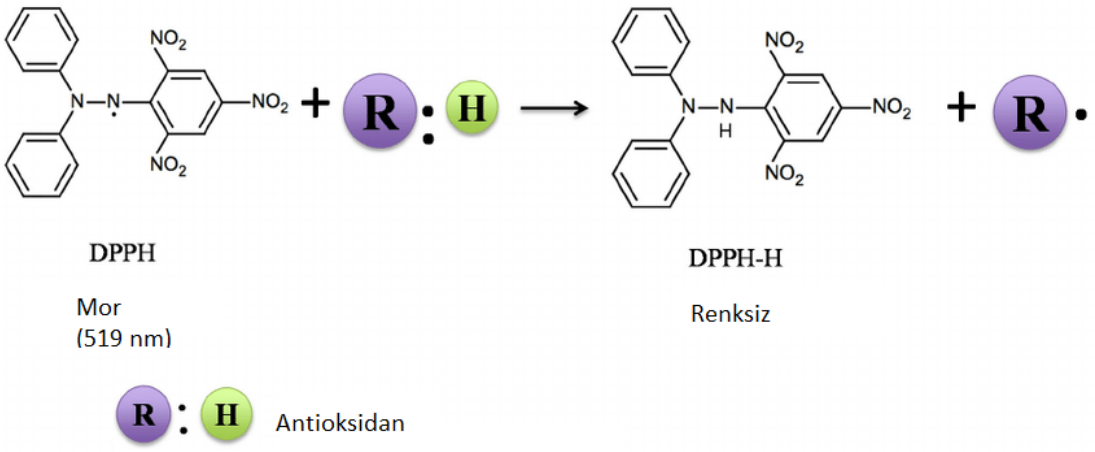
sürekli olarak karıştırıldı. Oklusif koşul sağlamak amacıyla hücrelerin üzeri parafilm ile kapatıldı. Ortam sıcaklığı 37ºC'de tutuldu, sabit hızda karıştırma deney süresince devam etti. Donör faz olarak, 2'şer ml resveratrol içeren lipozom, koenzim Q10 içeren lipozom, vitamin E içeren lipozom, resveratrol-koenzim Q10-vitamin E lipozomu ve resveratrol-koenzim Q10-vitamin E krem kullanıldı. 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 saat sonra reseptör solüsyonundan 1 ml örnekler alınarak etken madde miktar tayini HPLC ile yapıldı. Alınan örneğin yerine aynı sıcaklık ve hacimde reseptör faz eklendi. Ölçümler üç paralel olarak yapıldı. Reseptör fazdan alınan örnekler 0,22 μm gözenek boyutlu bir filtreden süzülerek, HPLC şişelerine alındı. Numunelerdeki etken maddelerin miktarı HPLC yöntemleri ile analiz edildi.

3.2.21. Antioksidan Etki Tayini

Geliştirilen lipozom formülasyonlarından *in vitro* salım sonunda tayin edilen etken madde miktarları belirlenmiş ve antioksidan etkisi tayin edilmiştir.

Antioksidan aktivite için $DPPH^{\bullet}$ radikal süpürücü aktivite spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Doğal veya sentetik bileşiklerin DPPH süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin mor renginin giderilmesiyle tayin edilir. Bu yöntemde, bileşiklerin DPPH radikaliyle oluşturdukları renk, 517 nm'de ölçülür. Ardından standart madde ile karşılaştırılır. Bir hidrojen atomu verebilecek bir madde ve DPPH çözeltisi karıştırıldığında, mor renk kaybolur ve indirgenmiş forma dönüşür. DPPH radikali ve antioksidan molekül arasında reaksiyon Şekil 3-6'da gösterildiği gibi gerçekleşir (265).



Şekil 3-2: DPPH ile antioksidan molekül arasındaki reaksiyon (265)

DPPH-H, indirgenmiş formu ve R● , ilk basamakta oluşan serbest radikali ifade eder. Daha sonra bu radikal, indirgeyici bir molekül tarafından indirgenen (rengi giderilen) ve tüm stokiyometriyi kontrol eden DPPH moleküllerinin sayısı kadar reaksiyona girer. Bu nedenle yukarıdaki reaksiyon doymamış bir maddenin ya da bir lipidin otooksidasyonu gibi okside edici bir sistem içinde gerçekleşen reaksiyonlar için bir temel oluşturmaktadır.

500 µL örnek; 1,5 mL 0,1 mM metanolde hazırlandı. Ardından DPPH• çözeltisi ile karıştırıldı. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. Ardından absorbanslar 517 nm'de okundu. Denklem 3-6 ile inhibisyon yüzdesi hesaplandı. Analizler üç paralel yapıldı ve ortalama değerler kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = [\ (\text{Absorbans}_{\text{kontrol}} - \text{Absorbans}_{\text{örnek}}) / \text{Absorbans}_{\text{kontrol}}\ ] * 100$$

(3-6)(265)

3.2.22. Sonuçların İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tezdeki tüm deneyler en az üç tekrarlı ve ortalama olarak gerçekleştirildi ve ± S.S. (Standart Sapma) değerleri hesaplandı.

3.2.22.1. Aritmetik Ortalama ($\bar{x}$)

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin aritmetik ortalamaları Eşitlik 3-3 ile hesaplandı.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n} \quad \textbf{(3-3)}$$

3.2.22.2. Standart Sapma (SD)

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin standart sapmaları Eşitlik 3-4 ile hesaplandı.

$$SD = \pm \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1} \quad \textbf{(3-4)}$$

n: Örnek sayısı (örnek sayısı 30'dan küçük olduğunda n-1 olarak kullanıldı)

xi : Örnek numarası

$\bar{x}$: Örnek ortalaması

3.2.22.3. Bağıl Standart Sapma

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin bağıl standart sapması Eşitlik 3-5 ile hesaplandı.

$$\%\,RSD = \frac{SD}{\bar{x}} 100 \quad \textbf{(3-5)}$$

3.2.22.4. Güven Aralığı

Bu tez çalışmasında elde edilen verilerin güven aralığı (GA) Eşitlik 3-6 ile hesaplandı.

$$GA = \bar{x} \pm z \frac{SS}{\sqrt{(n)}} \quad \textbf{(3-6)}$$

3.2.22.5. Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA)

Bu tez çalışmasında ikiden fazla bağımsız ortalamalar arasındaki farklılıkları test etmek için ANOVA testi kullanıldı. İki grup arasındaki P (olasılık) değeri P<0,05'ten küçük ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

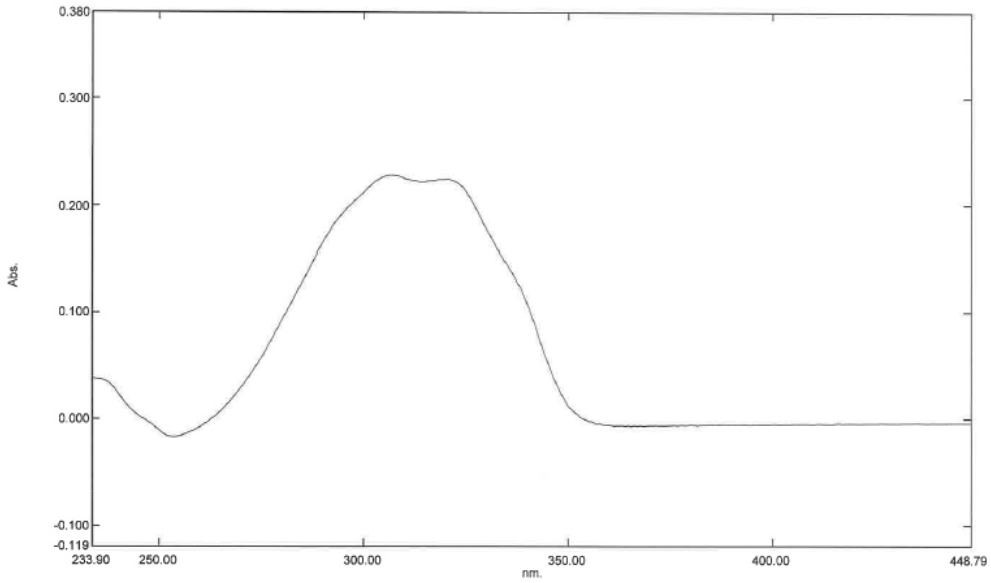
4. BULGULAR

Bu bölümde 3.Bölüm'de yapılışları anlatılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler tablolar ve grafikler halinde sunulmuştur. Tablolardaki ''n'' değerleri, in vitro çalışmalarda yapılan paralel deney sayısını göstermektedir. Yapılan deneyler sonucu elde edilen değerlerle, ortalama, standart sapma (S.S), bağıl sapma (B.S) ve % 95 olasılıklı güven seviyesi (± G.S) değerleri hesaplanmış, sonuçlar tablo ve grafiklerde gösterilmiştir.

4.1. Resveratrole Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.1.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular

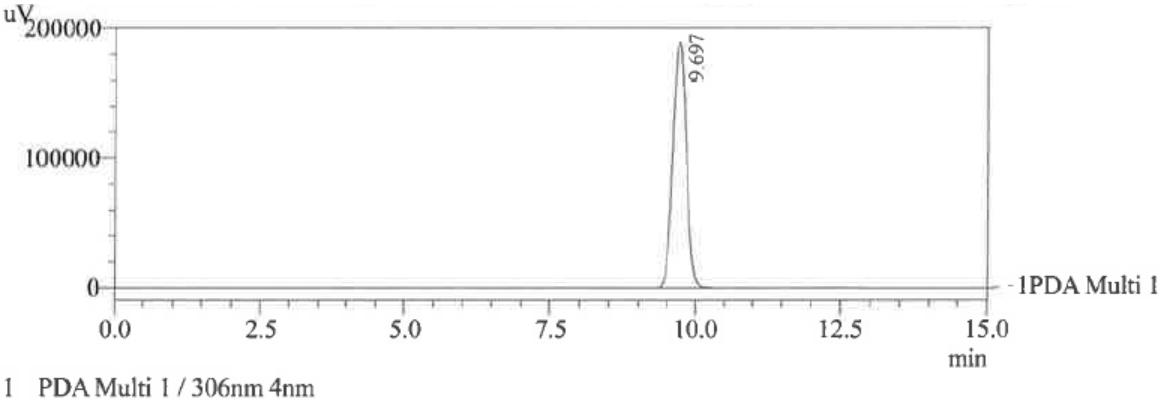
Resveratrolün UV spektrumu Şekil 4-1'de gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda resveratrolün maksimum dalga boyu verdiği absorbansın (λ_{max}) 306 nm olduğu görüldü.



Şekil 4-1: Transresveratrole ait 200-300 nm arası dalga boyu taraması

4.1.2. HPLC Yöntemiyle Resveratrol Miktar Tayini Yönteminin Validasyonuna Ait Bulgular

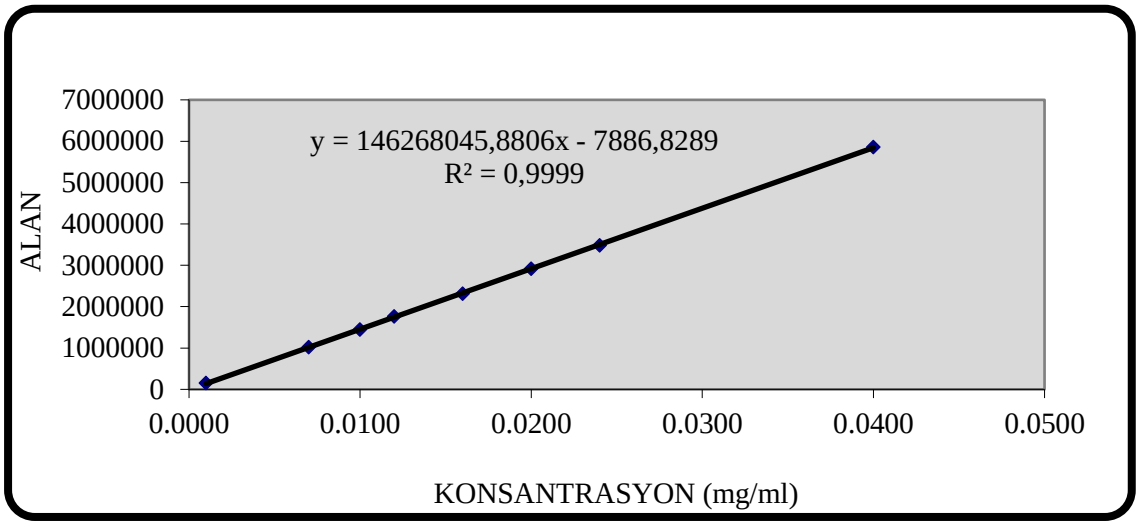
Resveratrol HPLC'ye enjekte edildiğinde elde edilen pik Şekil 4-2'de görülmektedir.



Şekil 4-2: Transresveratrole ait HPLC kromatogramı

4.1.2.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Kullanılan konsantrasyon aralığında, kalibrasyon eğrisinin y = 146268045,8806x - 7886,8289 doğrusal bir regresyon denklemi ve R^2 = 0,9999 kare korelasyon katsayısı ürettiği gösterilmiştir. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 25'te verilmiştir. Doğrusallık için genel kabul kriteri 0,998 veya daha yüksek bir korelasyon katsayısıdır. Bu nedenle, trans-resveratrolün kalibrasyon eğrisinin 0.9999 korelasyon katsayısı (R^2) ile doğrusaldır, test edilen aralıkta doğrusallık göstermektedir.



Şekil 4-3: Resveratrolün HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=3)

4.1.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Resveratrolün geri kazanım ile hesaplanan miktarları (n=3)

Resveratrol Miktarı (%)	Konulan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	Geri Kazanım (%)
%5 -1	0,00100	0,00096	96,276
%5 -2	0,00100	0,00096	96,273
%5 -3	0,00100	0,00096	95,794
%100 -1	0,02000	0,01952	97,594
%100 -2	0,02000	0,01954	97,704
%100 -3	0,02000	0,01953	97,640
%150 -1	0,03000	0,02930	97,674
%150 -2	0,03000	0,02929	97,645
%150 -3	0,03000	0,02922	97,386
		Ortalama	97,110
		S.S	0,765
		RSS	0,787
		Güven Sınırı	0,588
		Güven Aralığı	96,522 - 97,697

Hesaplanan konsantrasyonlar ve geri kazanım yüzdeleri Tablo 4-1'de gösterilmiştir. Hesaplanan ortalama geri kazanım miktarları, kabul edilebilir olarak kabul edilen %90-110 aralığındadır.

4.1.2.3. Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.3'te anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-2 ve Tablo 4-3'te verilmiştir.

Resveratrol için deney içi kesinlik sonuçları Tablo 4-2'de gösterilmiştir. % Bağıl sapma %2.0'dan küçüktür.

Tablo 4 - 2: Resveratrolün deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	**Resveratrol Çözeltisinin Derişimi (mg/mL)**	**Bulunan Resveratrol Çözeltisi Derişimi(mg/mL)**
1	0.02	0,02006
2	0.02	0,02020
3	0.02	0,01914
4	0.02	0,01884
5	0.02	0,01902
6	0.02	0,01880
Ortalama	0.02	99,7
S.S		0,73
B.S		0,73
±Güven sınırı		0.77
Güven aralığı		98. 9 – 100.4

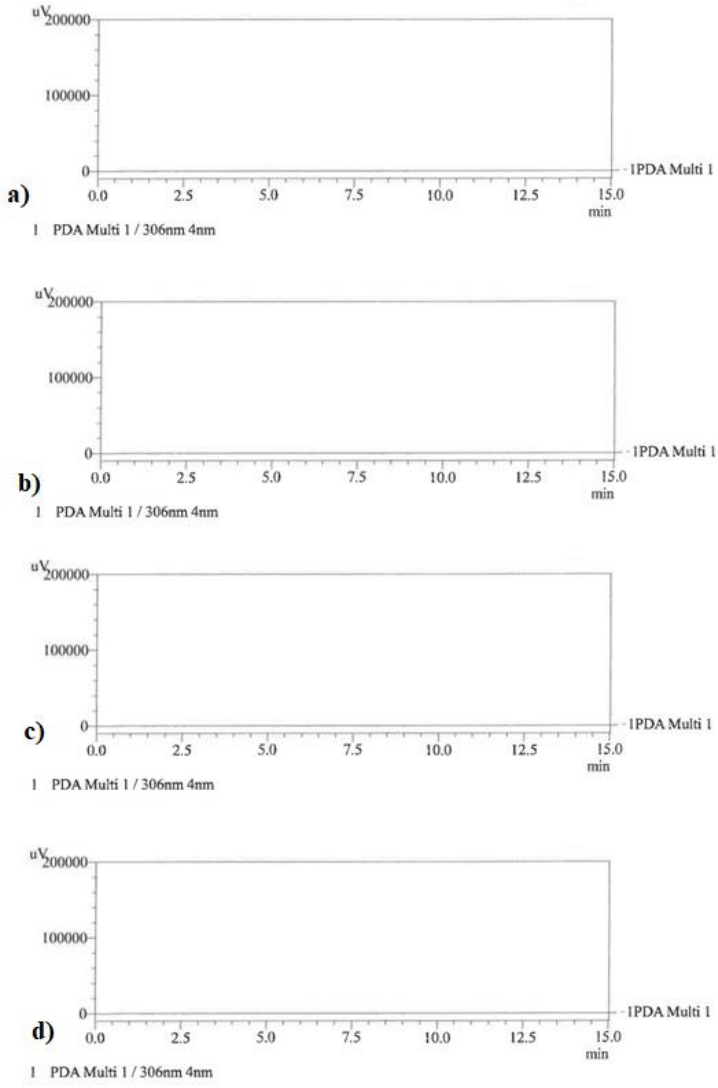
Resveratrolün deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 4-3'te gösterilmiştir. Varyasyon katsayıları %2'den küçük olduğu için kullanılan yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4 - 3: Resveratrolün deneyler arası kesinlik sonuçları

	Derişim(mg/mL)		
Numune	**0.001**	**0.01**	**0.02**
	Alan	**Alan**	**Alan**
1	150503	1448546	2918767
2	150480	1448408	2915055
3	149351	1450541	2918032
ORT	150111	1449165	2917285
S.S	659	1194	1966
Varyasyon Katsayısı	0,44	0,08	0,07
N	3	3	3

4.1.2.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Trans-resveratrol içermeyen lipozom formülasyonunun HPLC absorbansı, boş bir okuma olarak ölçüldü. Resveratrolün pik verdiği dalga boyunda, resverfatrol ile aynı zamanda boş lipozom, koenzim Q10 ve vitamin E'nin pik vermediği gösterildi. Yöntemin resveratrol tayinine uygun olduğuna karar verildi. Bu yöntemin trans-resveratrol analizi için özel olduğu bulunmuştur, çünkü trans-resveratrol eğrisinde diğer maddelerin pikleri ile çakışan başka pikler yoktur. Diğer bir deyişle resveratrol piki spesifiktir. Şekil 4-4'te resveratrolün pik verdiği dalga boyunda resveratrol ile aynı zamanda mobil faz, boş lipozom, koenzim Q10 ve vitamin E'nin pik vermediği görülmektedir.



Şekil 4-4: Resveratrolün pik verdiği dalga boyunda a) mobil faz, b) boş lipozom, c) koenzim Q10 ve d) vitamin E'ye ait kromatogramlar

4.1.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar bölüm 3.2.2.5'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.014 µg/mL, saptama sınırı 0.045 µg/mL olarak bulundu.

4.1.3. Resveratrolün Çözünürlüğüne Ait Bulgular

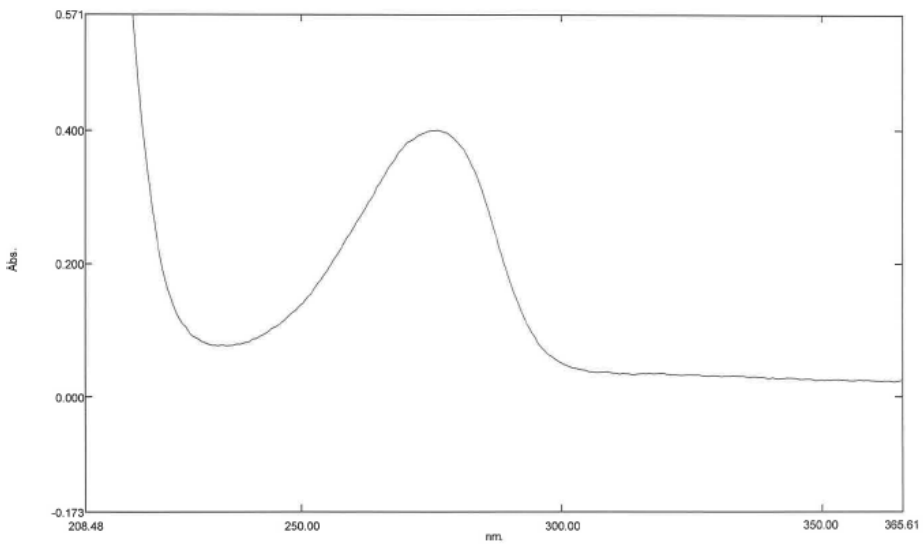
Resveratrolün pH 7.4'de hazırlanan PBS (fosfat tamponlu salin) içindeki çözünürlüğü yaklaşık 100 µg/ml olarak bulunmuştur. Resveratrolün PBS içerisindeki çözünürlüğü, maddenin lipofilik özelliğinden dolayı oldukça düşüktür. Franz difüzyon

hücresi çalışmalarında reseptör kompartmanında uygun sink koşulunun sağlanabilmesi ve maddenin reseptör ortamına difüzyonunu arttırmak için reseptör çözeltisine çözünürlüğü arttırcı madde (HCO-60) ve etanol eklenmiştir. Resveratrolün HCO-60:etanol:PBS (2:20:78, h/h/h) çözeltisi içerisindeki çözünürlüğü yaklaşık olarak 42 mg/ml olarak bulunmuştur.

4.2. Koenzim Q10'a Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.2.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular

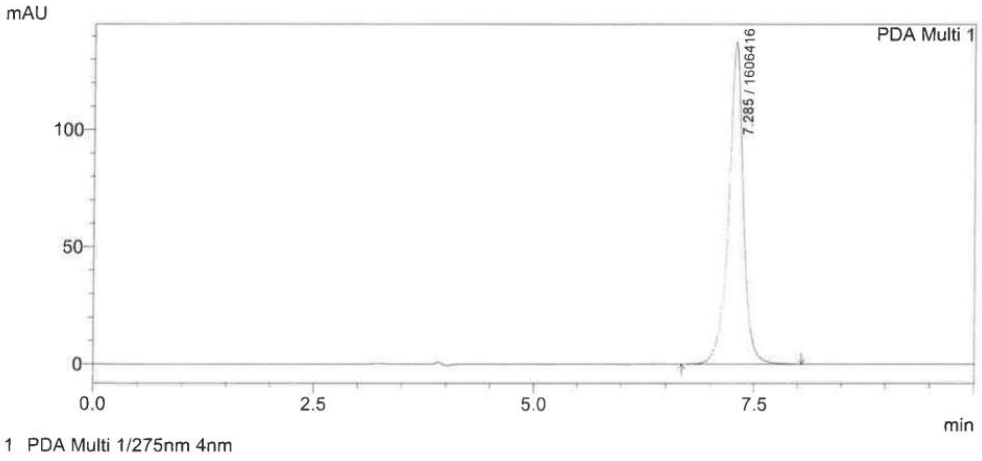
Koenzim Q10'un UV spektrumu Şekil 34'te gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda Koenzim Q10'un maksimum dalga boyu verdiği absorbansın (λ_{max}) 275 nm olduğu görüldü.



Şekil 4-5: Koenzim Q10'a ait 200-300 nm arası dalga boyu taraması

4.2.2. HPLC Yöntemiyle Koenzim Q10Miktar Tayini YöntemininValidasyonuna Ait Bulgular

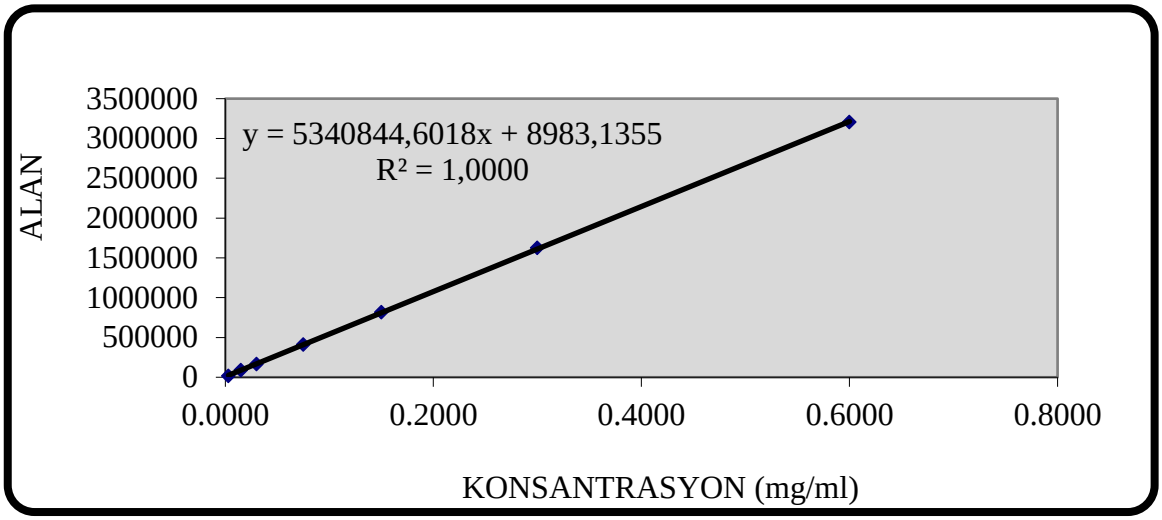
Koenzim Q10 HPLC'ye enjekte edildiğinde elde edilen pik Şekil 4-6'da görülmektedir.



Şekil 4-6: Koenzim Q10 piki

4.2.2.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Kullanılan konsantrasyon aralığında, kalibrasyon eğrisinin y = 5340844,6018x + 8983,1355 doğrusal bir regresyon denklemi ve R^2 = 1,0000 kare korelasyon katsayısı ürettiği gösterilmiştir. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 4-7'de verilmiştir. Doğrusallık için genel kabul kriteri 0,998 veya daha yüksek bir korelasyon katsayısıdır. Bu nedenle, koenzim Q10'un kalibrasyon eğrisinin 1,0000 korelasyon katsayısı (R^2) ile doğrusaldır, test edilen aralıkta doğrusallık göstermektedir.



Şekil 4-7: Koenzim Q10'un HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=3)

4.2.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım

Çalışmalar Bölüm 3.2.2.2'de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-4'te verilmiştir.

Tablo 4-4: Koenzim Q10'un geri kazanım ile hesaplanan miktarları (n=3)

Koenzim Q10 Miktarı (%)	Konulan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	Geri Kazanım (%)
%5 -1	0,00100	0,00098	98,000
%5 -2	0,00100	0,00097	97,000
%5 -3	0,00100	0,00098	98,000
%100 -1	0,02000	0,01965	98,250
%100 -2	0,02000	0,01970	98,500
%100 -3	0,02000	0,01972	98,600
%150 -1	0,03000	0,02950	98,333
%150 -2	0,03000	0,02960	98,667
%150 -3	0,03000	0,02962	98,733
		Ortalama	98,23
		S.S	0,53
		RSS	0,54
		Güven Sınırı	0,41
		Güven Aralığı	97,82 – 98,64

Hesaplanan konsantrasyonlar ve geri kazanım yüzdeleri Tablo 4-4'te gösterilmiştir. Hesaplanan ortalama geri kazanım miktarları, kabul edilebilir olarak kabul edilen %90-110 aralığındadır.

4.2.2.3. Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.5.3' de anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-5 ve Tablo 4-6'da verilmiştir.

Koenzim Q10 için deney içi kesinlik sonuçları Tablo 4-5'te gösterilmiştir. % Bağıl sapma %2.0'dan küçüktür.

Tablo 4-5: Koenzim Q10'un deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	**Koenzim Q10 Çözeltisinin Derişimi (mg/mL)**	**Bulunan Koenzim Q10 Çözeltisi Derişimi(mg/mL)**
1	0,3	0,3045
2	0,3	0,30345
3	0,3	0,30354
4	0,3	0,30393
5	0,3	0,30483
6	0,3	0,30327
Ortalama	0,3	0,304
S.S		0,2
B.S		0,2
±Güven sınırı		0,22
Güven aralığı		101,1 – 101,5

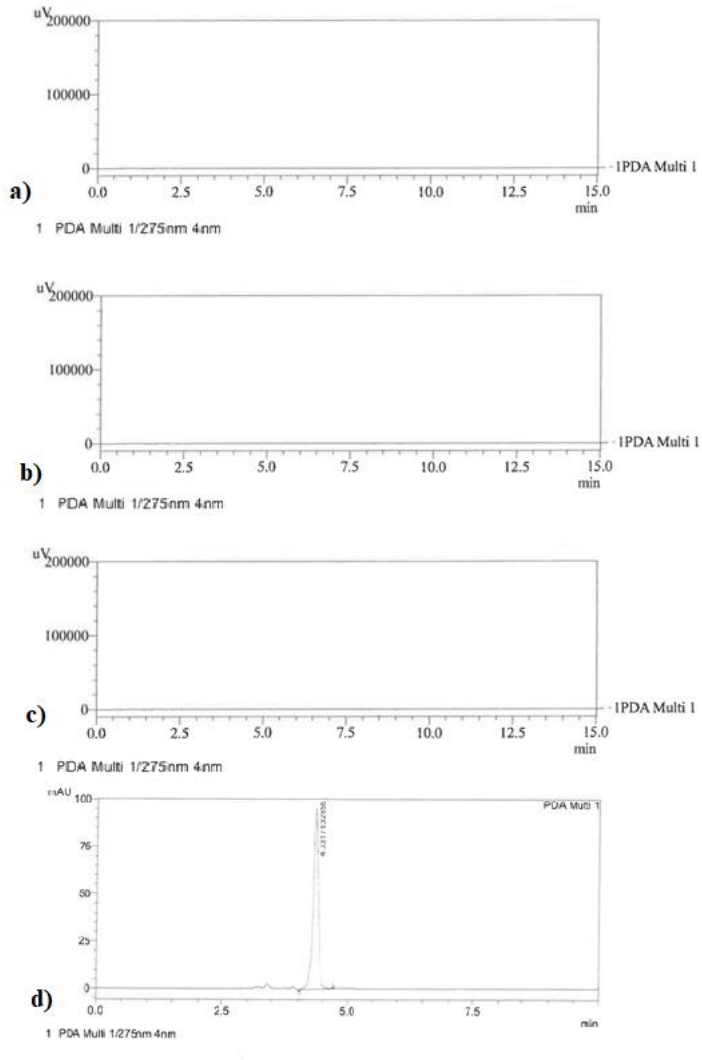
Koenzim Q10'un deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 4-6'da gösterilmiştir. Varyasyon katsayıları %2'den küçük olduğu için kullanılan yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4-6: Koenzim Q10'un deneyler arası kesinlik sonuçları

	Derişim(mg/mL)		
Numune	**0.015**	**0.03**	**0.15**
	Alan	**Alan**	**Alan**
1	90541	162740	815935
2	89681	164539	816042
3	89438	165029	815457
ORT	89887	164103	815811
S.S	580	1205	2977
Varyasyon Katsayısı	0,64	0,73	0,04
n	3	3	3

4.2.2.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.2.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Koenzim Q10'un pik verdiği dalga boyunda koenzim Q10 ile ile aynı zamanda mobil faz, boş lipozom ve resveratrolün pik vermediği, Vitamin E'nin ise farklı zamanda pik verdiği gösterildi. Yöntemin Koenzim Q10 tayinine uygun olduğuna karar verildi. Şekil 4-8'de mobil faz, boş lipozom, resveratrol ve vitamin E'ye ait pikler görülmektedir.



Şekil 4-8: Koenzim Q10'un pik verdiği dalga boyunda a) mobil faz, b) boş lipozom, c) resveratrol ve d) vitamin E'ye ait kromatogramlar

4.2.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar bölüm 3.2.2.5'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.166 µg/mL, saptama sınırı 0.5 µg/mL olarak bulundu.

4.2.3. Koenzim Q10'un Çözünürlüğüne Ait Bulgular

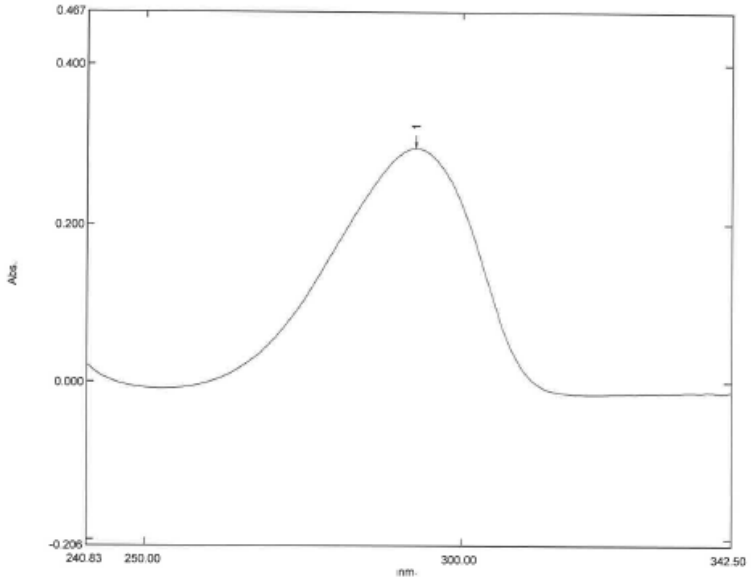
Koenzim Q10'un pH 7.4'de hazırlanan PBS (fosfat tamponlu salin) içindeki çözünürlüğü yaklaşık 0,195 µg/ml olarak bulunmuştur. Koenzim Q10'un PBS içerisindeki çözünürlüğü, maddenin lipofilik özelliğinden dolayı oldukça düşüktür. Franz difüzyon hücresi çalışmalarında reseptör kompartmanında uygun sink koşulunun sağlanabilmesi ve maddenin reseptör ortamına difüzyonunu arttırmak için reseptör

çözeltisine çözünürlüğü arttırcı madde (HCO-60) ve etanol eklenmiştir. Koenzim Q10'un HCO-60:ethanol:PBS (2:20:78, h/h/h) çözeltisi içerisindeki çözünürlüğü yaklaşık olarak 3 mg/ml olarak bulunmuştur.

4.3. Vitamin E'ye Ait Çalışmalarla İlgili Bulgular

4.3.1. UV Spektrumuna Ait Bulgular

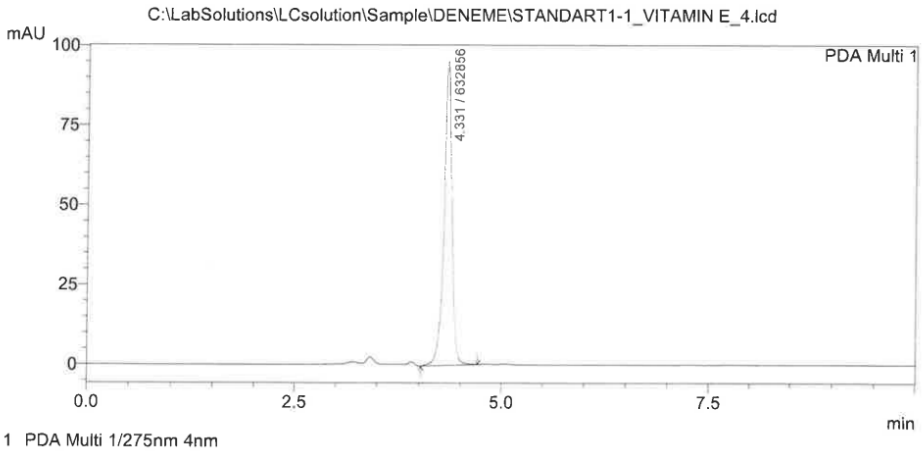
Vitamin E'nin UV spektrumu Şekil 4-7'de gösterilmiştir. Dalga boyu taraması sonucunda Vitamin E'nin maksimum dalga boyu verdiği absorbansın (λ_{max}) 275 nm olduğu görüldü.



Şekil 4-9: Vitamin E 'ye ait 240-340 nm arası dalga boyu taraması

4.3.2. HPLC Yöntemiyle Resveratrol Miktar Tayini YöntemininValidasyonuna Ait Bulgular

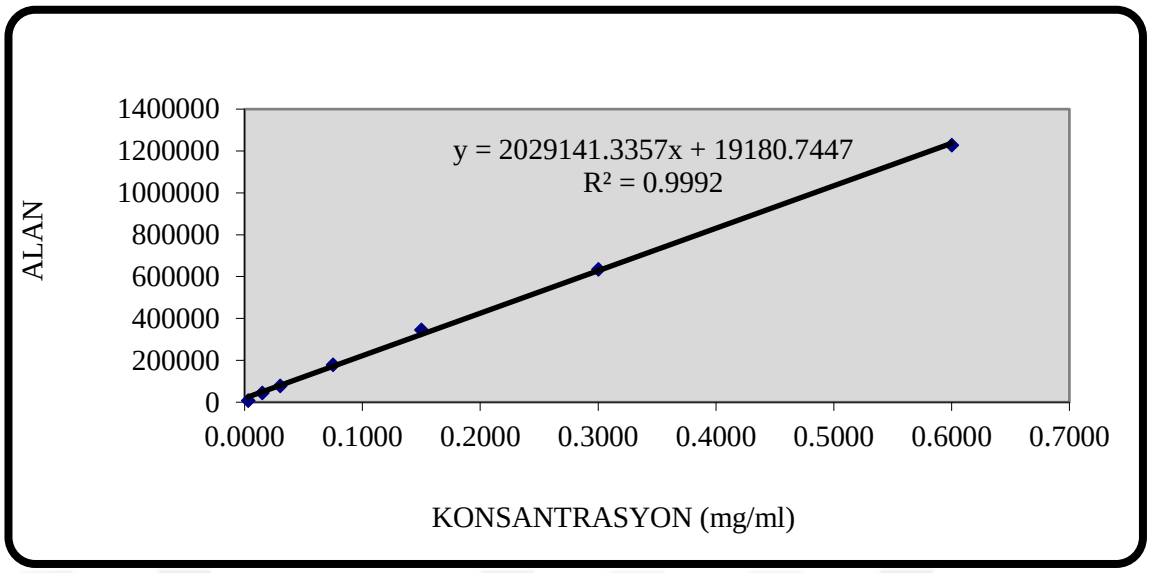
Vitamin E HPLC'ye enjekte edildiğinde elde edilen pik Şekil 4-10'da görülmektedir.



Şekil 4-10: Vitamin E piki

4.3.2.1. Doğrusallık

Çalışmalar, Bölüm 3.2.8.1'de anlatıldığı gibi yapıldı. Hesaplanan pik alanlarına karşılık konsantrasyonlar grafiğe geçirildi. En küçük kareler yöntemine göre değerlendirilip, standart doğru denklemi bulundu ve doğrusallığı kanıtlandı. Kullanılan konsantrasyon aralığında, kalibrasyon eğrisinin y = 2029141,3357x + 19180,7447 doğrusal bir regresyon denklemi ve R^2 = 0,9992 kare korelasyon katsayısı ürettiği gösterilmiştir. Elde edilen konsantrasyon pik alanı grafiği Şekil 4-11'de verilmiştir. Doğrusallık için genel kabul kriteri 0,998 veya daha yüksek bir korelasyon katsayısıdır. Bu nedenle, trans-resveratrolün kalibrasyon eğrisinin 0,9992 korelasyon katsayısı (R^2) ile doğrusaldır, test edilen aralıkta doğrusallık göstermektedir.



Şekil 4-11: Vitamin E'nin HPLC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği (n=3)

4.3.2.2. Doğruluk ve Geri Kazanım

Çalışmalar Bölüm 3.2.6.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-7' de verilmiştir.

Tablo 4-7: Vitamin E'nin geri kazanım ile hesaplanan miktarları (n=3)

Vitamin E Miktarı (%)	Konulan Konsantrasyon (mg/ml)	Bulunan Konsantrasyon (mg/ml)	Geri Kazanım (%)
%5 -1	0,00100	0,00095	95,000
%5 -2	0,00100	0,00097	97,000
%5 -3	0,00100	0,00098	98,000
%100 -1	0,02000	0,01978	98,900
%100 -2	0,02000	0,01972	98,600
%100 -3	0,02000	0,01973	98,650
%150 -1	0,03000	0,02969	98,967
%150 -2	0,03000	0,02968	98,933
%150 -3	0,03000	0,02971	99,033
		Ortalama	98,12
		S.S	1,34
		RSS	1,36
		Güven Sınırı	1,03
		Güven Aralığı	97,09 – 99,15

Hesaplanan konsantrasyonlar ve geri kazanım yüzdeleri Tablo 4-7'de gösterilmiştir. Hesaplanan ortalama geri kazanım miktarları, kabul edilebilir olarak kabul edilen %90-110 aralığındadır.

4.3.2.3. Kesinlik

Çalışmalar Bölüm 3.2.8.3' te anlatıldığı gibi yapıldı. Sonuçlar Tablo 4-8 ve Tablo 4-9'da verilmiştir.

Vitamin E için deney içi kesinlik sonuçları Tablo10'da gösterilmiştir. % Bağıl sapma %2.0'dan küçüktür.

Tablo 4-8: Vitamin E'nin deney içi kesinlik sonuçları

Örnek No	Vitamin E ÇözeltisininDerişimi (mg/mL)	Bulunan Vitamin E Çözeltisi Derişimi(mg/mL)
1	0,3	0,301
2	0,3	0,304
3	0,3	0,300
4	0,3	0,299
5	0,3	0,299
6	0,3	0,299
Ortalama	0,3	0,300
S.S		0,6
B.S		0,6
±Güven sınırı		0,65
Güven aralığı		99,4 – 100,7

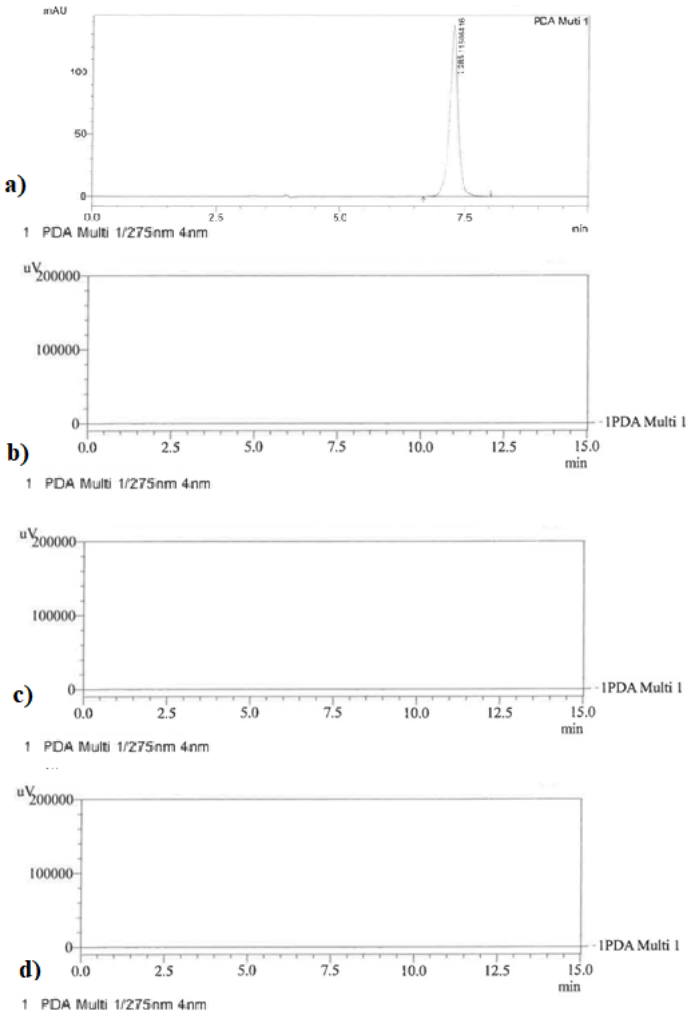
Vitamin E'nin deneyler arası kesinlik sonuçları Tablo 4-9'da gösterilmiştir. Varyasyon katsayıları %2'den küçük olduğu için kullanılan yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Tablo 4-9: Vitamin E'nin deneyler arası kesinlik sonuçları

	Derişim(mg/mL)		
Numune	**0.015**	**0.030**	**0.15**
	Alan	**Alan**	**Alan**
1	44068	77812	345249
2	44531	77730	344678
3	44577	77784	344734
ORT	44392	77775	344887
S.S	282	42	315
Varyasyon Katsayısı	0,63	0,05	0,09
n	3	3	3

4.3.2.4. Özgünlük ve Seçicilik

Çalışmalar bölüm 3.2.8.4'te anlatıldığı gibi yapıldı. Vitamin E'nin pik verdiği dalga boyunda boş lipozom, resveratrol ve mobil fazın pik vermediği, koenzim Q10'un farklı dakikada pik verdiği gösterildi (Şekil 4-12). Yöntemin vitamin E tayinine uygun olduğuna karar verildi.



Şekil 4-12: a) Koenzim Q10 b) Resveratrol c) Boş lipozom d) mobil faz kromatogramları

4.3.2.5. Duyarlılık ve Saptama Sınırı

Hesaplar bölüm 3.2.2.5'te verilen formüllere göre yapıldı. Analitik yöntemin duyarlılığı 0,185 µg/mL, saptama sınırı 0,561 µg/mL olarak bulundu.

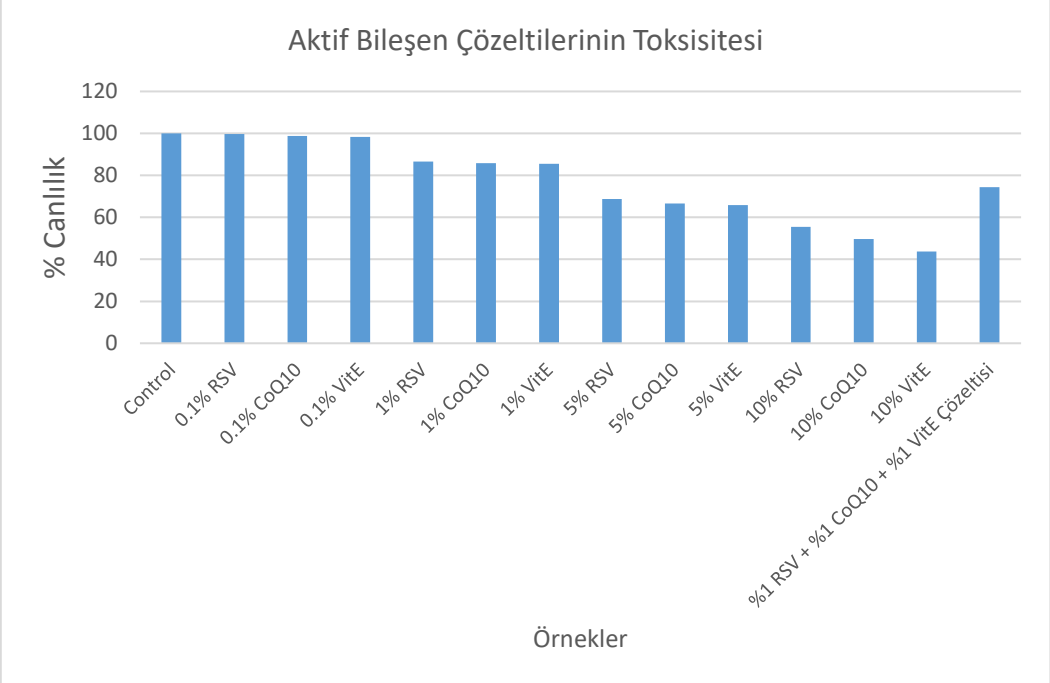
4.3.1. Vitamin E'nin Çözünürlüğüne Ait Bulgular

Vitamin E'nin pH 7.4'de hazırlanan PBS (fosfat tamponlu salin) içindeki çözünürlüğü yaklaşık 20,9 µg/ml olarak bulunmuştur. Vitamin E'nin PBS içerisindeki çözünürlüğü, maddenin lipofilik özelliğinden dolayı oldukça düşüktür. Franz difüzyon hücresi çalışmalarında reseptör kompartmanında uygun sink koşulunun sağlanabilmesi ve maddenin reseptör ortamına difüzyonunu arttırmak için reseptör çözeltisine

çözünürlüğü arttırcı madde (HCO-60) ve etanol eklenmiştir. Vitamin E'nin HCO-60:etanol:PBS (2:20:78, h/h/h) çözeltisi içerisindeki çözünürlüğü yaklaşık olarak 20,5 mg/ml olarak bulunmuştur.

4.4. Aktif Bileşenlerin Sitotoksisite Testlerine Ait Bulgular

MTT testi Yöntem 3.2.10'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. Etken madde çözeltilerinin uygulandığı L929 fare fibroblast hücrelerindeki hücre canlılığı Şekil 4-13'da gösterilmiştir. Test sonucu farklı konsantrasyondaki etken madde çözeltilerinde (%0,1-10) konsantrasyon arttıkça, hücre canlılığında azalma görülmektedir. Hücre canlılığının %50 ve üzerinde olduğu %1 resveratrol % Koenzim Q10 ve % 1 Vitamin E içeren çözelti uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir.



Şekil 4-13: Farklı konsantrasyonlarda aktif bileşen çözeltilerinin L929 fare fibroblast hücre hattındakitoksisitesi (n=3)

4.5. Lipozom Formülasyonlarına Ait Bulgular

4.5.1. Boş Lipozomlara Ait Bulgular

Farklı konsantrasyonlarda soya lesitini: kolesterol içeren boş lipozom formülasyonları ince film hidratasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozom formülasyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri Tablo 4-10'da gösterilmiştir.

Tablo 4-10: Boş lipozomların partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

	Soya lesitini (%)	**Kolesterol (%)**	**Partikül boyutu (nm)**	**PDI**	**Zeta potansiyel (mV)**
1	2	2	74,62	0,23	-50,5
2	2,25	1,75	78,8	0,275	-46,9
3	2,5	1,5	79,5	0,28	-48
4	3	1	81,2	0,282	-48
5	3,5	0,5	81,3	0,288	-48,8

Elde edilen veriler ışığında en uygun soya lesitini: kolesterol konsantrasyonları % 2 soya lesitini ve %2 kolesterol olarak belirlenmiş ve bu konsantrasyona sahip formülasyon tekrar hazırlanarak partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli analizi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan boş lipozomun partikül boyutu 76,616 nm ± 0,03, polidispersite indeksi 0,231 ± 0,01 ve zeta potansiyeli - 50,189 mV ± 0,8 olarak kaydedilmiştir.

4.5.2. Aktif Bileşen İçeren Lipozomlara Ait Bulgular

Hazırlanan formülasyonlar Tablo 4-11'de gösterilmiştir.

Tablo 4-11: Lipozom formülasyonları

Formülasyon	Deiyonize su (%)	Soya lesitini (%)	Kolesterol (%)	Trans-resveratrol (%)	Koenzim Q10 (%)	Vitamin E (%)
Boş lipozom	96	2	2	-	-	-
RSV-Lipo	95	2	2	1	-	-
KoQ10-Lipo	95	2	2	-	1	-
VitE-Lipo	95	2	2	-	-	1
RSV-KoQ10-VitE-Lipo	93	2	2	1	1	1

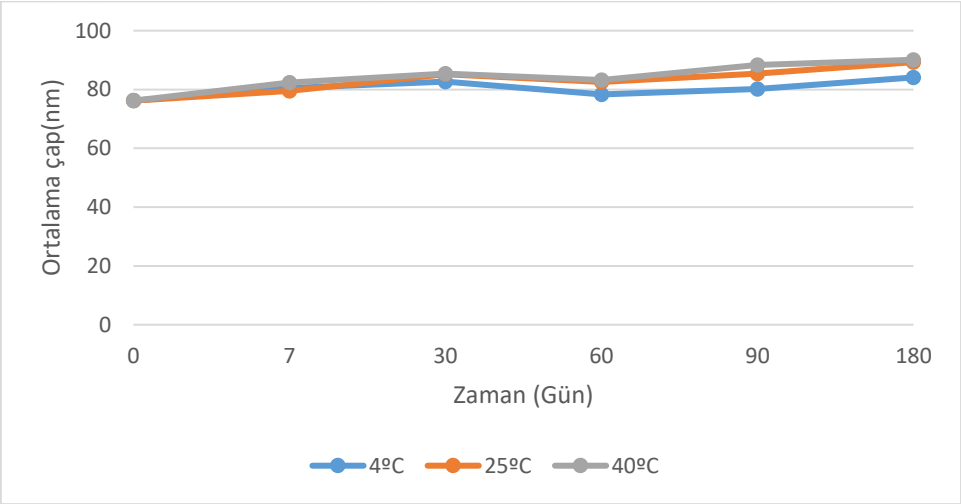
4.5.3. Lipozomların Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.5.3.1. Boş lipozomların Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Lipozomların partikül büyüklükleri Laser Diffraction Particle Sizer cihazı ile ölçüldü. Etken madde içermeyen lipozomların partikül büyüklükleri 76,2 ± 0,01 nm olarak ölçüldü. Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüklerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla 4, 25 ve 40ºC'de saklanan lipozomların 0, 7, 30, 60, 90, 180. günlerde yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerinin sonuçları Tablo 4-12 ile Şekil 4-14'da, partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları Tablo 4-12 ile Şekil 4-15'te gösterilmiştir.

Tablo 4-12: Boş lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları

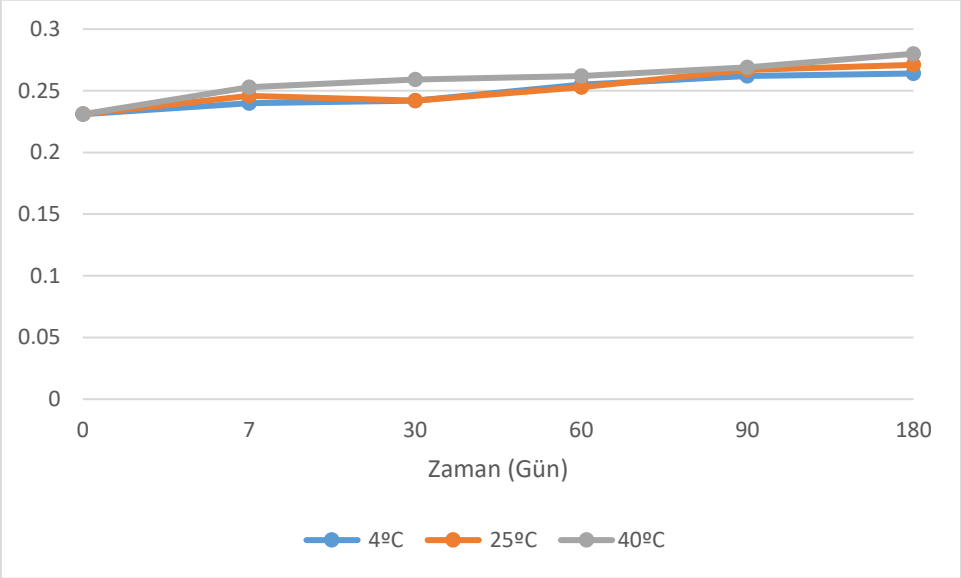
Zaman (Gün)	Ortalama çap(nm) ± S.S(4ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S(25ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S(40ºC)
0	76,2 ± 0,01	76,2 ± 0,01	76,2 ± 0,04
7	80,5 ± 0,01	79,5 ± 0,03	82,4 ± 0,02
30	82,7 ± 0,02	85,2 ± 0,01	85,4 ± 0,03
60	78,3 ± 0,01	82,6 ± 0,06	83,2 ± 0,03
90	80,2 ± 0,04	85,4 ± 0,01	88,3 ± 0,01
180	84,1 ± 0,03	89,3 ± 0,02	90,1 ± 0,01



Şekil 4-14: Boş lipozomlara ait partikül büyüklüğü sonuçları

Tablo 4-13: Boş lipozomlara ait PDI sonuçları

Zaman (Gün)	PDI (4ºC)	PDI (25ºC)	PDI (40ºC)
0	0,231± 0,04	0,231± 0,04	0,231 ± 0,04
7	0,240 ± 0,01	0,246 ± 0,02	0,253 ± 0,03
30	0,242 ± 0,02	0,242 ± 0,03	0,259 ± 0,02
60	0,255 ± 0,02	0,253 ± 0,05	0,262 ± 0,03
90	0,262 ± 0,03	0,267 ± 0,04	0,269 ± 0,01
180	0,264 ± 0,01	0,271 ± 0,01	0,280 ± 0,02



Şekil 4-15: Boş lipozomlara ait PDI sonuçları

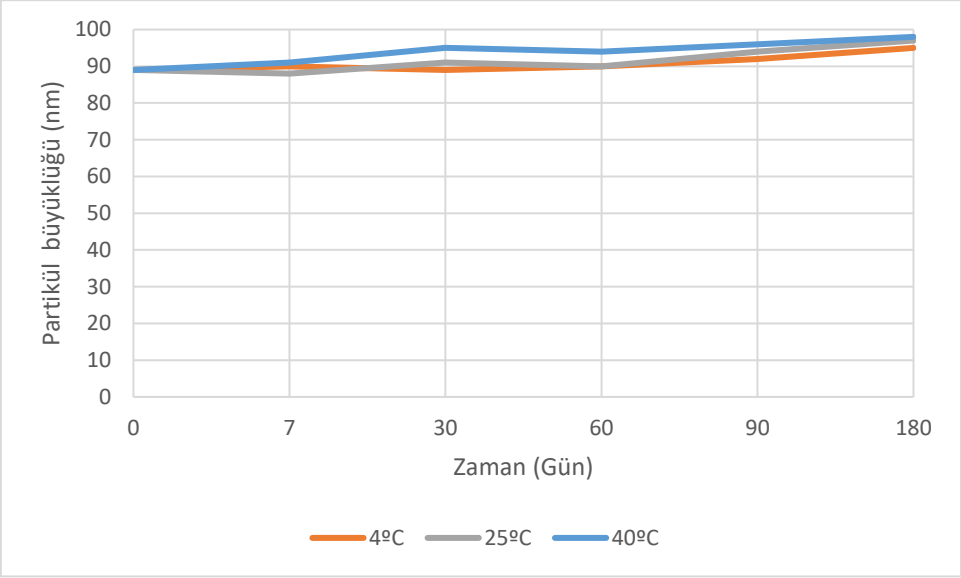
4.5.3.2. Resveratrol Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Tablo 4-14: Resveratrol lipozomlarına ait damlacık büyüklüğü sonuçları

Lipozomların partikül büyüklükleri Laser Diffraction Particle Sizer aleti ile ölçüldü. Resveratrol içeren lipozomların partikül büyüklükleri 89,02 ± 0,04 nm olarak ölçüldü. Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüklerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla 4, 25, 40ºC'de saklanan lipozomların 0, 7, 30, 60, 90, 180. günlerde yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerinin sonuçları Tablo 4-13 ile Şekil 4-16'da, partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları Tablo 4-14 ile Şekil 4-17'de gösterilmiştir.

Tablo 4-14: Resveratrol lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

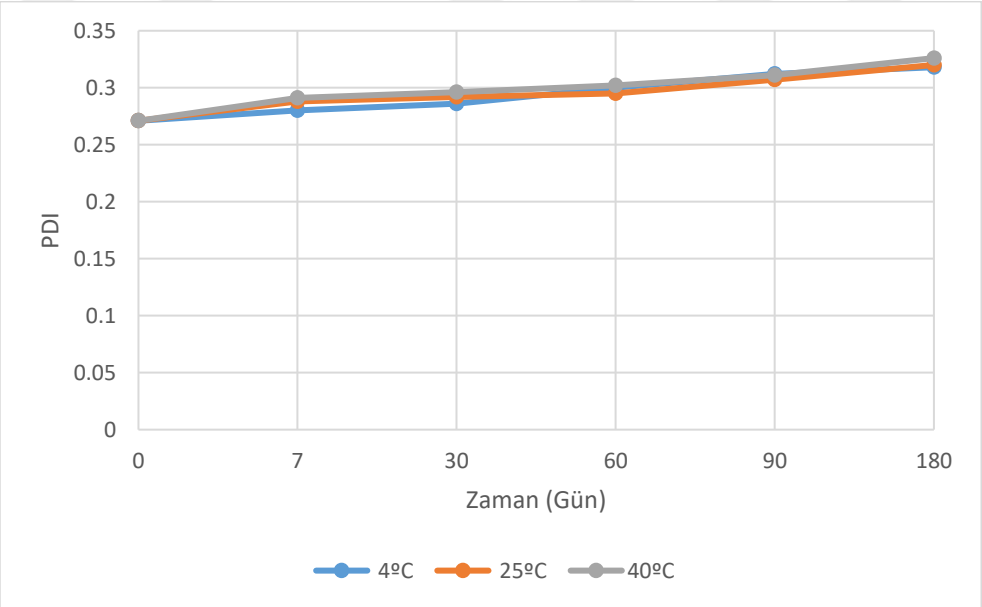
Zaman (Gün)	Ortalama çap(nm) ± S.S(4ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S(25ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S(40ºC)
0	89,02 ± 0,04	89,02 ± 0,04	89.02 ± 0,04
7	90,34± 0,03	88,32 ± 0,04	91,28 ± 0,01
30	89,66 ± 0,01	91,03 ± 0,02	95,78 ± 0,03
60	90,28± 0,02	90,64 ± 0,05	94,33 ± 0,02
90	92,45 ± 0,02	94,54 ± 0,03	96,76 ± 0,01
180	95,75 ± 0,01	97,30 ± 0,02	98,05 ± 0,02



Şekil 4-16: Resveratrol lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

Tablo 4-15: Resveratrol lipozomlarına ait partikül dağılımı sonuçları

Zaman (Gün)	PDI ± S.S(4ºC)	PDI ± S.S(25ºC)	PDI ± S.S(40ºC)
0	0,271 ± 0,02	0,271 ± 0,02	0,271 ± 0,02
7	0,280 ± 0,02	0,288 ± 0,01	0,291 ± 0,03
30	0,286 ± 0,01	0,292 ± 0,03	0,296 ± 0,01
60	0,300 ± 0,04	0,295 ± 0,05	0,302 ± 0,04
90	0,312 ± 0,03	0,307 ± 0,05	0,311 ± 0,02
180	0,318 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,326 ± 0,02



Şekil 4-17: Resveratrol lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları

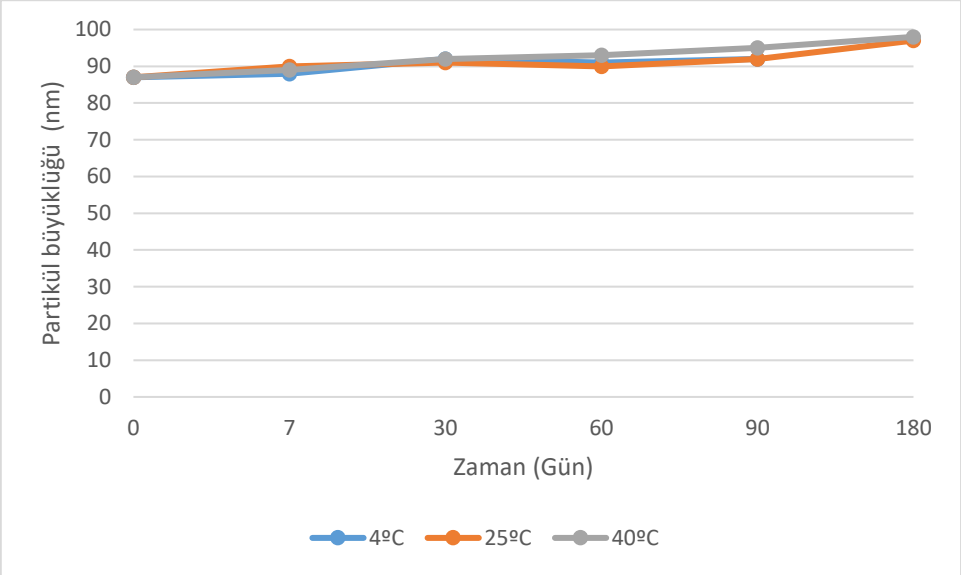
4.5.3.3. Koenzim Q10 Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Lipozomların partikül büyüklükleri Laser Diffraction Particle Sizer aleti ile ölçüldü. Koenzim Q10 içeren lipozomların partikül büyüklükleri 87,55 ± 0,02 nm olarak ölçüldü. Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüklerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla 4ºC, 25ºC, 40 ºC'de saklanan lipozomların 0, 7, 30, 60, 90, 180. günlerde yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerinin sonuçları Tablo 4-15 ile

Şekil 4-18'da, partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları Tablo 4-16 ile Şekil 4-19'de gösterilmiştir.

Tablo 4-16: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

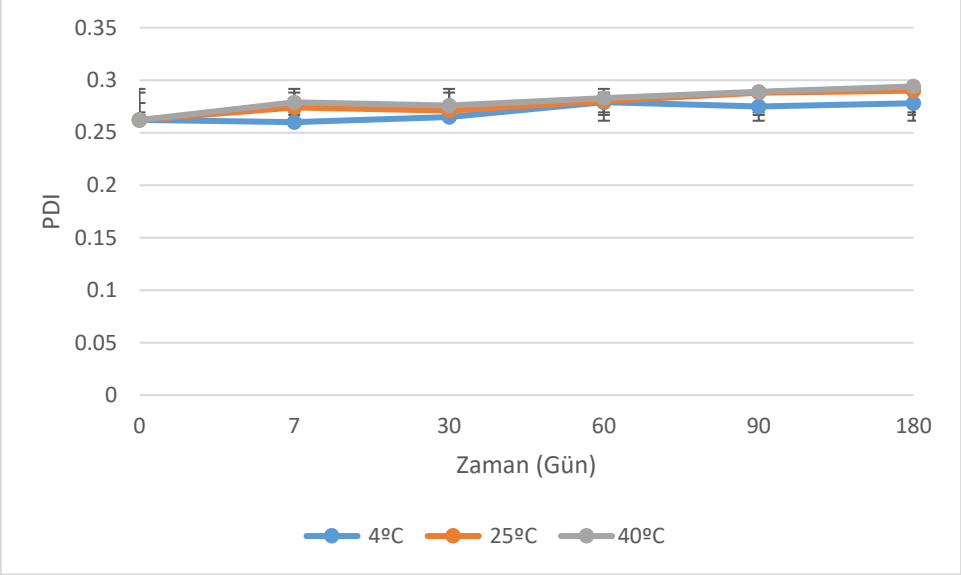
Zaman (Gün)	Ortalama çap(nm) ±S.S(4ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S(25ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S(40ºC)
0	87,55 ± 0,02	87,55 ± 0,02	87,55 ± 0,02
7	88,45 ± 0,01	90,340 ± 0,03	89,35 ± 0,02
30	92,55 ± 0,02	91,75 ± 0,01	92,80 ± 0,03
60	91,33 ± 0,02	90,45 ± 0,04	93,77 ± 0,04
90	91,50 ± 0,03	92,70 ± 0,01	95,35 ± 0,02
180	95,75 ± 0,02	97,80 ± 0,02	98,20 ± 0,01



Şekil 4-18: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

Tablo 4-17: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları

Zaman (Gün)	PDI ± S.S(4ºC)	PDI ± S.S(25ºC)	PDI ± S.S(40ºC)
0	0,262 ± 0,03	0,262 ± 0,03	0,262 ± 0,03
7	0,260 ± 0,02	0,274 ± 0,03	0,279 ± 0,01
30	0,265 ± 0,01	0,271 ± 0,02	0,276 ± 0,02
60	0,279 ± 0,05	0,280 ± 0,01	0,283 ± 0,02
90	0,275 ± 0,01	0,288 ± 0,02	0,289 ± 0,04
180	0,278 ± 0,02	0,290 ± 0,01	0,294 ± 0,01



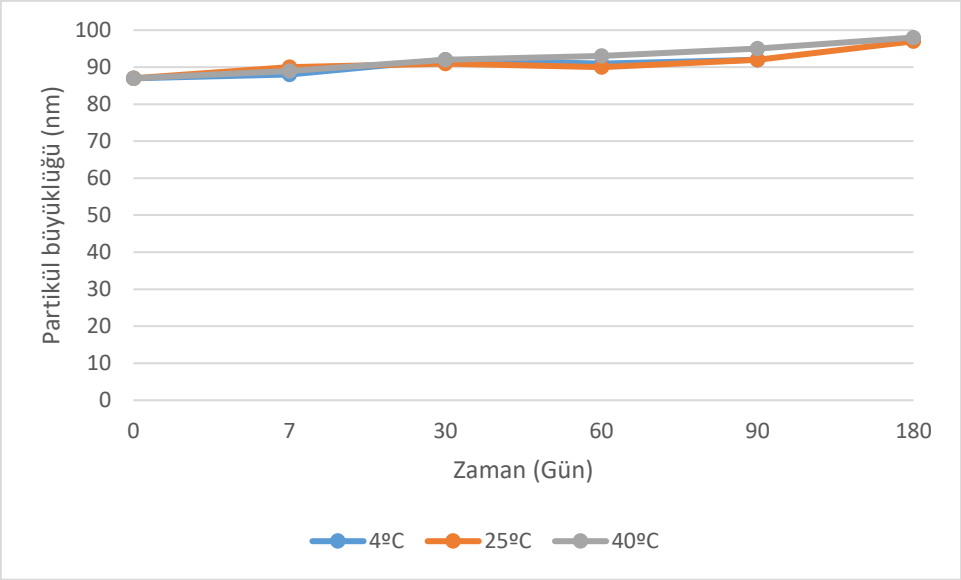
Şekil 4-19: Koenzim Q10 lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları

4.5.3.4. Vitamin E Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Lipozomların partikül büyüklükleri Laser Diffraction Particle Sizer aleti ile ölçüldü. Vitamin E içeren lipozomların partikül büyüklükleri 90,45 ± 0,03 nm olarak ölçüldü. Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüklerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla 4, 25 ve 40ºC'de saklanan lipozomların 0, 7, 30, 60, 90, 180. günlerde yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerinin sonuçları Tablo 4-17 ile Şekil 4-20'de, partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları Tablo 4-18 ile Şekil 4-21'te gösterilmiştir.

Tablo 4-18: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

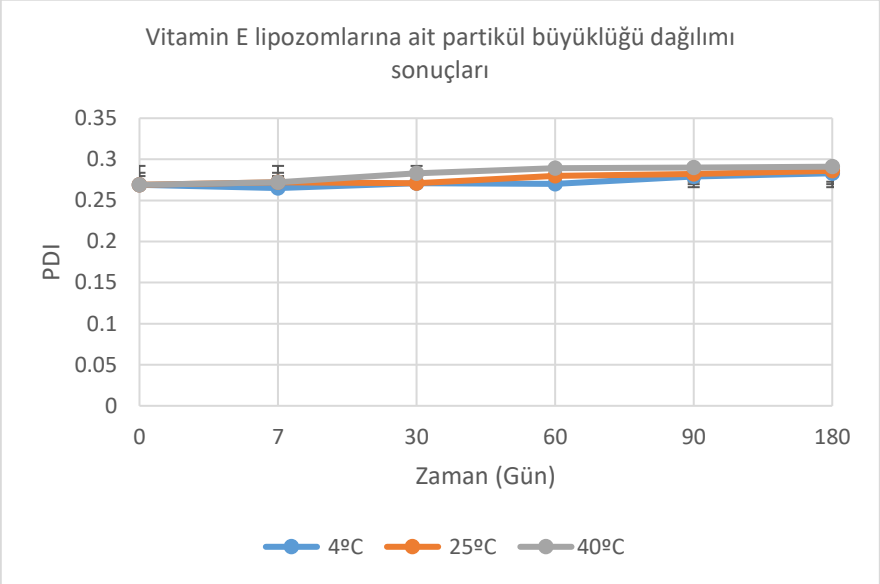
Zaman (Gün)	Ortalama çap (nm) ± S.S(4ºC)	Ortalama çap (nm) ± S.S(25ºC)	Ortalama çap (nm) ± S.S(40ºC)
0	90,45 ± 0,03	90,45 ± 0,03	90,45 ± 0,03
7	92,33 ± 0,02	88,38 ± 0,01	91,25 ± 0,03
30	89,37 ± 0,04	87,20 ± 0,02	95,35 ± 0,04
60	90,25 ± 0,02	90,03 ± 0,02	93,80 ± 0,02
90	92,75 ± 0,03	91,40 ± 0,01	96,75 ± 0,03
180	95,20 ± 0,01	98,25 ± 0,02	98,33 ± 0,02



Şekil 4-20: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

Tablo 4-19: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları

Zaman (Gün)	PDI ± S.S(4ºC)	PDI ± S.S(25ºC)	PDI ± S.S(40ºC)
0	0,269 ± 0,02	0,269 ± 0,02	0,269 ± 0,02
7	0,265 ± 0,02	0,272 ± 0,03	0,272 ± 0,01
30	0,271 ± 0,01	0,271 ± 0,04	0,283 ± 0,03
60	0,270 ± 0,04	0,280 ± 0,01	0,289 ± 0,03
90	0,279 ± 0,02	0,282 ± 0,02	0,290 ± 0,04
180	0,283 ± 0,03	0,286 ± 0,03	0,293 ± 0,02



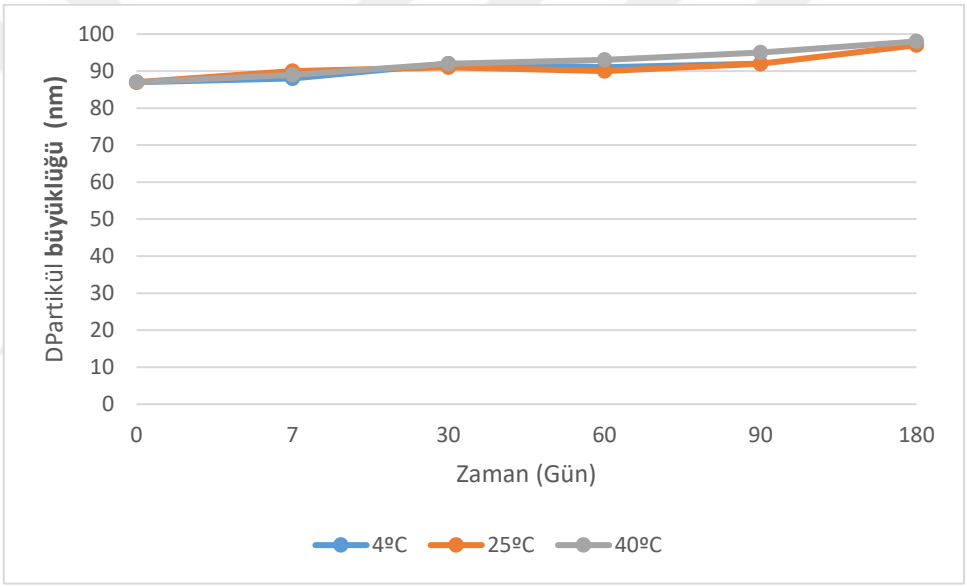
Şekil 4-21: Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları

4.5.3.5. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E Lipozomlarının Partikül Büyüklüğü ve Dağılımına Ait Bulgular

Lipozomların partikül büyüklükleri Laser Diffraction Particle Sizer cihazı ile ölçüldü. Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E içeren lipozomların partikül büyüklükleri 95.4 ± 0.02 nm olarak ölçüldü. Hazırlanan lipozomların partikül büyüklüklerinin zamanla değişip değişmediğini incelemek amacıyla 4, 25 ve 40ºC'de saklanan lipozomların 0, 7, 30, 60, 90, 180. günlerde yapılan partikül büyüklüğü ölçümlerinin sonuçları Tablo 4-19 ile Şekil 4-22'te, partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları Tablo 4-20 ile Şekil 4-23'te gösterilmiştir.

Tablo 4-20: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

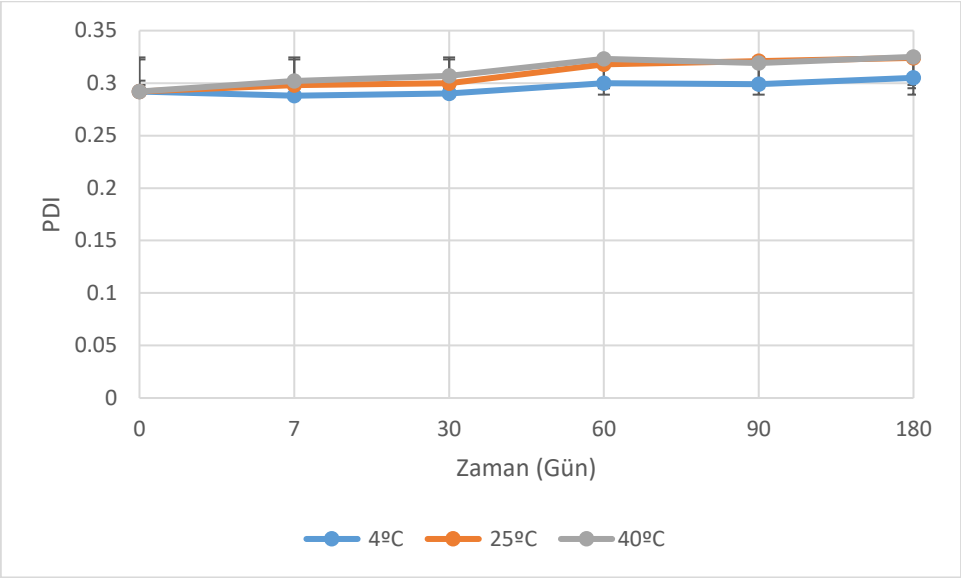
Zaman (Gün)	Ortalama çap(nm) ± S.S (4ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S (25ºC)	Ortalama çap(nm) ± S.S (40ºC)
0	95.4 ± 0.02	95.4 ± 0.02	95.4 ± 0.02
7	98.2 ± 0.01	99.3 ± 0.02	95.3 ± 0.02
30	95.4 ± 0.03	96.2 ± 0.01	97.5 ± 0.01
60	96.2 ± 0.03	97.5 ± 0.02	98.6 ± 0.03
90	95.3 ± 0.02	96.4 ± 0.01	100.2 ± 0.02
180	97.1 ± 0.01	98.7 ± 0.03	99.1 ± 0.03



Şekil 4-22: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü sonuçları

Tablo 4-21: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları

Zaman (Gün)	PDI ± S.S(4ºC)	PDI ± S.S(25ºC)	PDI ± S.S(40ºC)
0	0,292 ± 0,01	0,292 ± 0,01	0,292 ± 0,01
7	0, 288 ± 0,02	0,298 ± 0,01	0,302 ± 0,02
30	0,290 ± 0,02	0,300 ± 0,03	0,307 ± 0,01
60	0,300 ± 0,01	0,318 ± 0,02	0,323 ± 0,01
90	0,299 ± 0,02	0,321 ± 0,03	0,319 ± 0,04
180	0,305 ± 0,03	0,324 ± 0,02	0,325 ± 0,02



Şekil 4-23: Resveratrol, Koenzim Q10 ve Vitamin E lipozomlarına ait partikül büyüklüğü dağılımı sonuçları

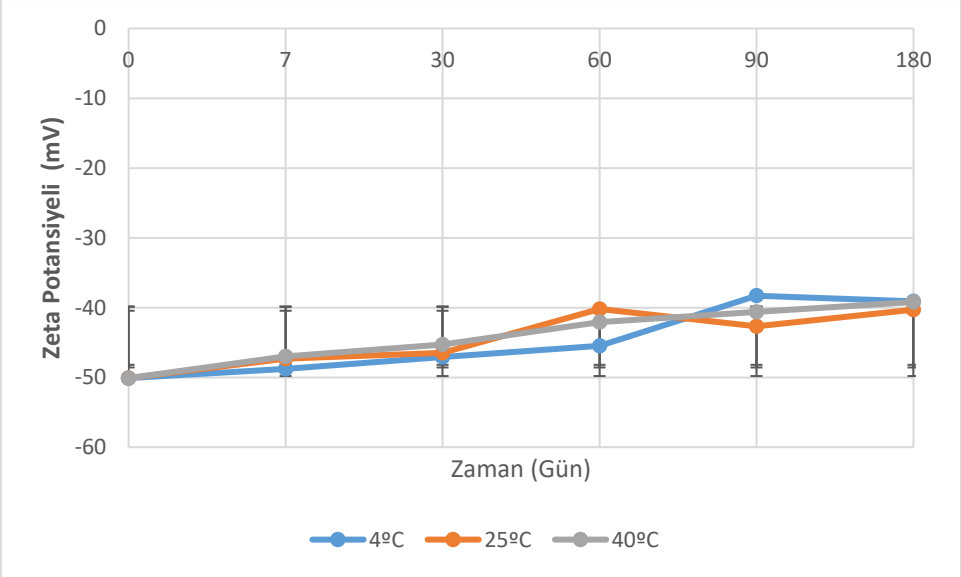
4.5.3.6. Aktif Madde İçermeyen Lipozomların Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Hazırlanan lipozomarın zeta potansiyelleri 0., 7, 30, 60 ve 90, 180. günlerde Malvern Zeta Sizer cihazı ile ölçüldü.

Boş lipozomların zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-21 ve Şekil 4-24'te görülmektedir.

Tablo 4-22: Boş lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları

Zaman (Gün)	Zeta Potansiyeli(mV) ± S.S (4ºC)	Zeta Potansiyeli(mV) ± S.S (25ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40ºC)
0	-50,1 ± 0,5	-50,1 ± 0,5	-50,1 ± 0,5
7	-48,8 ±0,9	-47,3 ± 1,0	-47 ± 0,8
30	-47,1 ±0,6	-46,5 ± 0,6	-45,3 ± 0,5
60	-45,5 ±1,0	-40,2 ± 0,5	-42,1 ± 0,6
90	-38,3 ±0,4	-42,7 ± 0,9	-40,6 ± 0,6
180	-39,1 ±0,2	-40,3 ±0,5	-39,2 ± 0,4



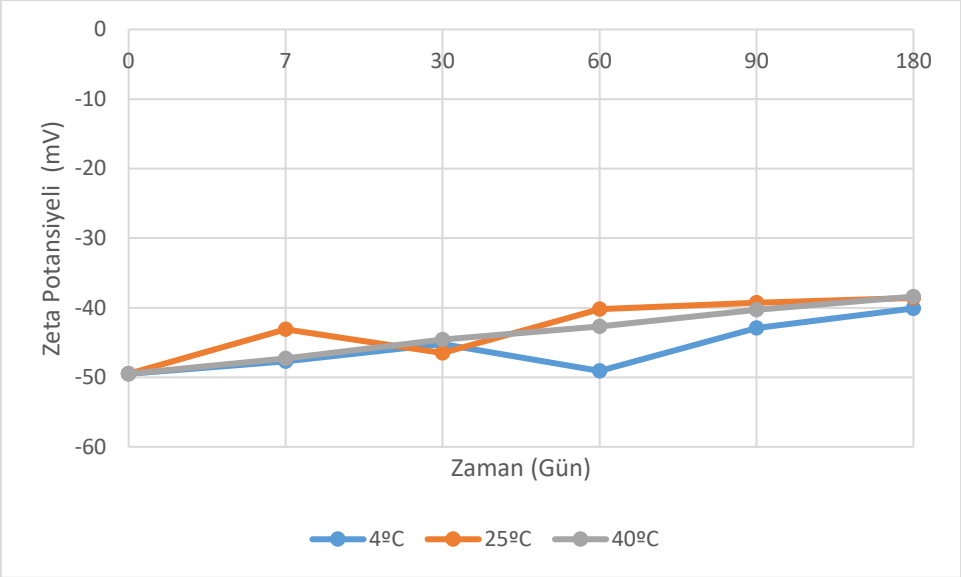
Şekil 4-24: Boş lipozomlara ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.3.7. Resveratrol Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Resveratrol lipozomlarının zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-22 ve Şekil 4-17'de görülmektedir.

Tablo 4-23: Resveratrol lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

Zaman (Gün)	Zeta Potansiyeli(mV) ± S.S (4ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (25ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40ºC)
0	-49,5 ±0,9	-49,5 ±0,9	-49,5 ±0,9
7	-47,7 ±0,9	-43,1 ±0,9	-47,3 ±0,5
30	-45,2 ±0,5	-46,5 ±0,4	-44,6 ±0,5
60	-49,1 ±0,5	-40,2 ±0,9	-42,7 ±0,3
90	-42,9 ±0,6	-39,3 ±0,6	-40,3 ±0,2
180	-40,1 ±0,4	-38,6 ±0,2	-38,4 ±0,4



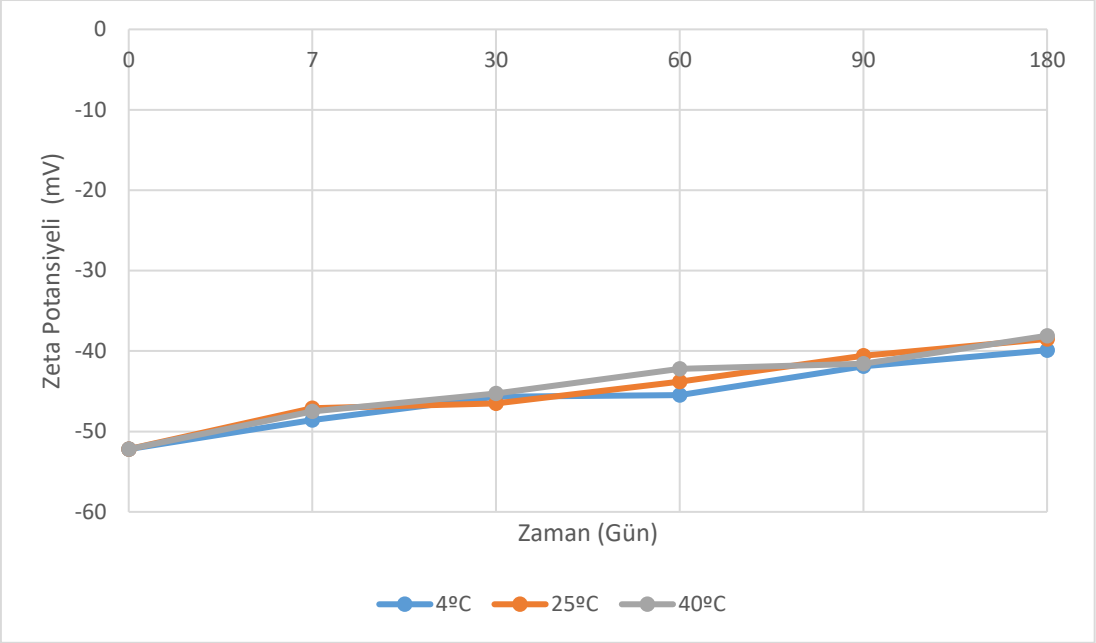
Şekil 4-25: Resveratrol lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.3.8. Koenzim Q10 Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Koenzim Q10 lipozomlarının zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-23 ve Şekil 4-26'da görülmektedir.

Tablo 4-24: Koenzim Q10 lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

Zaman (Gün)	Zeta Potansiyeli(mV) ± S.S (4ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (25ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40ºC)
0	-52,2 ±0,4	-52,2 ±0,4	-52,2 ±0,4
7	-48,6 ±0,3	-47,1 ±0,2	-47,5 ±0,3
30	-45,7 ±0,1	-46,5 ±0,5	-45,3 ±0,4
60	-45,5 ±0,5	-43,8 ±0,5	-42,2 ±0,2
90	-41,9 ±0,2	-40,6 ±0,3	-41,6 ±0,5
180	-39,9 ±0,2	-38,5 ±0,4	-38,1 ±0,4



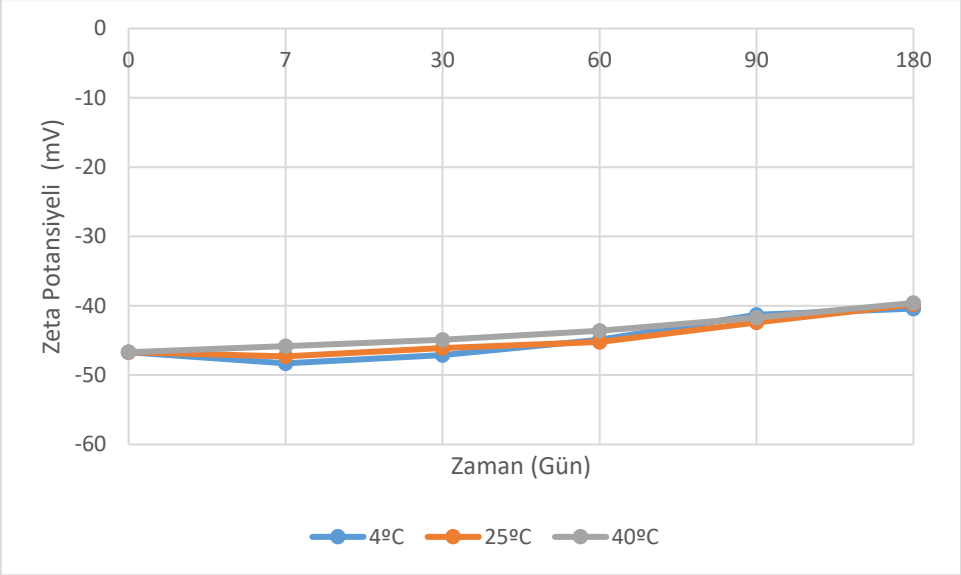
Şekil 4-26: Koenzim Q10 lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.3.9. Vitamin E Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Vitamin E lipozomlarının zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-24 ve Şekil 4-27'de görülmektedir.

Tablo 4-25: Vitamin E Lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

Zaman (Gün)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (4ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (25ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40ºC)
0	-46,7 ±0,3	-46,7 ±0,3	-46,7 ±0,3
7	-48,3 ±0,2	-47,3 ±0,1	-45,8 ±0,3
30	-47,1 ±0,1	-46,1 ±0,4	-44,9 ±0,1
60	-44,9 ±0,5	-45,2 ±0,2	-43,6 ±0,2
90	-41,3 ±0,2	-42,4 ±0,3	-41,7 ±0,5
180	-40,4 ±0,3	-39,8 ±0,2	-39,6 ±0,4



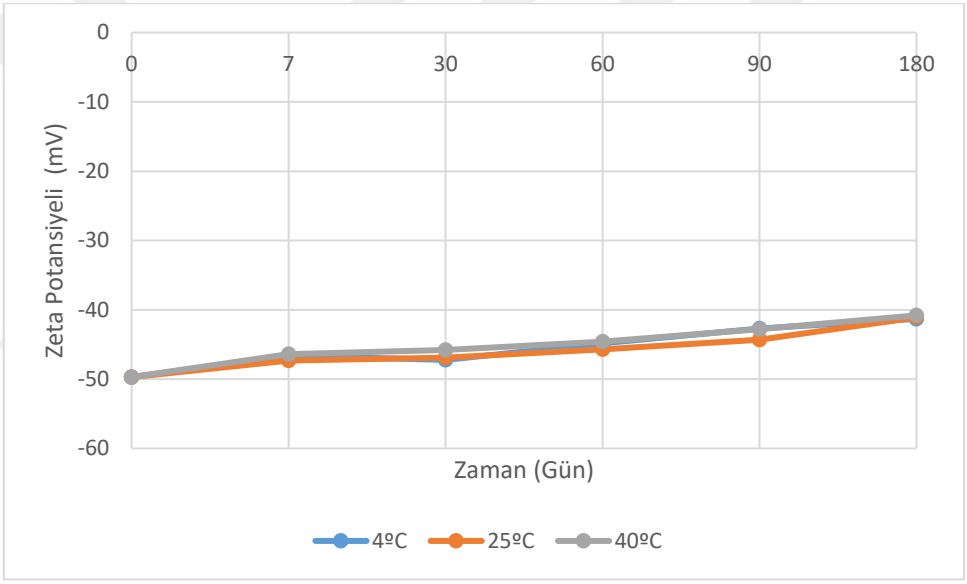
Şekil 4-27: Vitamin E lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.3.10. Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E Lipozomlarının Zeta Potansiyel Ölçümlerine Ait Bulgular

Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarının zeta potansiyel ölçümlerine ait bulgular Tablo 4-25 ve Şekil 4-28'de görülmektedir.

Tablo 4-26: Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

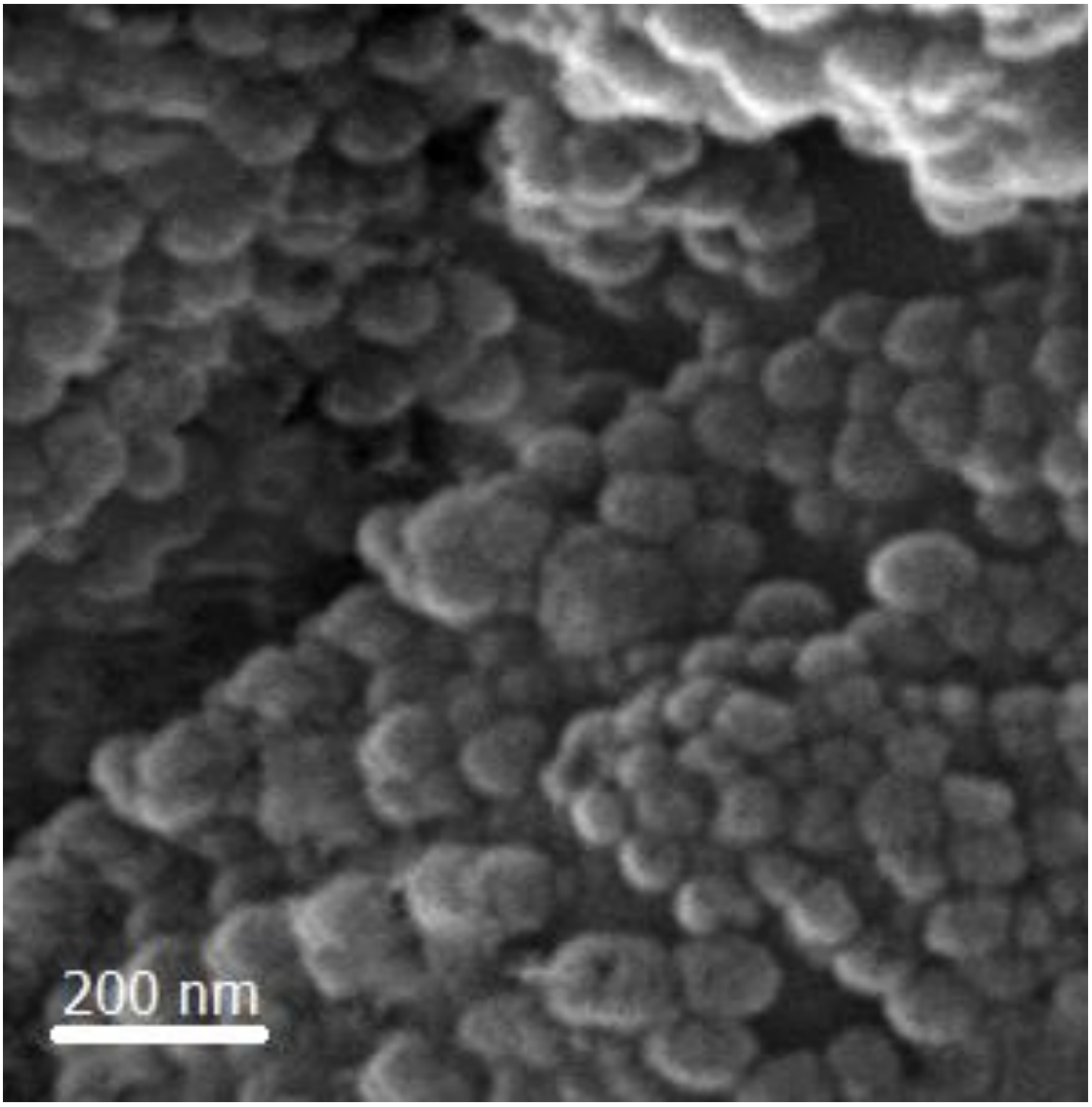
Zaman (Gün)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (4ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (25ºC)	Zeta Potansiyeli (mV) ± S.S (40ºC)
0	-49,7 ±0,2	-49,7 ±0,2	-49,7 ±0,2
7	-46,6 ±0,2	-47,3 ±0,2	-46,4 ±0,3
30	-47,2 ±0,4	-46,9 ±0,3	-45,8 ±0,5
60	-44,8 ±0,4	-45,7 ±0,5	-44,6 ±0,2
90	-42,7 ±0,2	-44,3 ±0,4	-42,8 ±0,4
180	-41,3 ±0,4	-41,1 ±0,2	-40,8 ±0,2



Şekil 4-28: Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarına ait zeta potansiyeli sonuçları

4.5.4. Lipozomların Şekilleri

Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarının elektron mikrosobu görüntüleri Şekil 4-18'da görülmektedir.



Şekil 4-29: Resveratrol, Koenzim Q10, Vitamin E lipozomlarının elektron mikroskobu görüntüsü

4.5.5. Lipozomların pH Değerleri

Lipozomların pH Değerleri Tablo 4-26 ve Şekil 4-19'da verilmiştir.

Tablo 4-27: Lipozomların pH değerleri (4 ºC)

Zaman (Gün)	Boş Lipozom	RSV-Lipo	KoQ10-Lipo	VitE-Lipo	RSV-KoQ10-VitE-Lipo
0	5,72 ±0,03	5,65 ±0,01	5,47 ±0,02	5,65 ±0,03	5,63 ±0,01
180	5,98 ±0,04	5,88 ±0,02	5,87 ±0,04	5,90 ±0,01	5,99 ±0,02

Tablo 4-28: Lipozomların pH değerleri (25 ºC)

Zaman (Gün)	Boş Lipozom	RSV-Lipo	KoQ10-Lipo	VitE-Lipo	RSV-KoQ10-VitE-Lipo
0	5,72 ±0,03	5,65 ±0,01	5,47 ±0,02	5,65 ±0,03	5,63 ±0,01
180	6,18 ±0,04	6,13 ±0,02	5,82 ±0,04	6,01 ±0,01	6,05 ±0,02

Tablo 4-29: Lipozomların pH değerleri (40 ºC)

Zaman (Gün)	Boş Lipozom	RSV-Lipo	KoQ10-Lipo	VitE-Lipo	RSV-KoQ10-VitE-Lipo
0	5,72 ±0,03	5,65 ±0,01	5,47 ±0,02	5,65 ±0,03	5,63 ±0,01
180	6,38 ±0,04	6,22 ±0,02	5,99 ±0,04	6,15 ±0,01	6,18 ±0,02

4.5.6. Lipozomlarda Aktif Bileşen Miktar Tayini

4.5.6.1. Lipozomlarda Hapsedilen Resveratrol Miktar Tayini

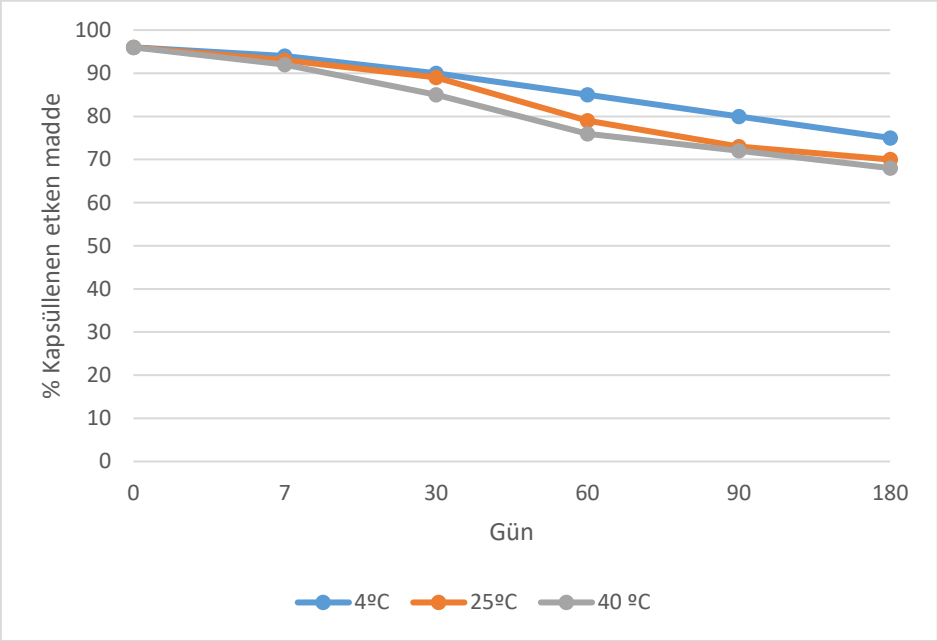
Lipozom formülasyonlarındaki aktif bileşen miktarı, Bölüm 3.2.2'de tarif edildiği gibi resveratrol için HPLC ile belirlendi. Sadece resveratrol içeren lipozomlarda, lipozom içine hapsedilen resveratrol miktarı ortalama %95,27 olarak

hesaplanmıştır. RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki hapsedilen resveratrol miktarı ortalama % 94,972 olarak hesaplanmıştır.

Farklı saklama koşullarında (4ºC, 25ºC ± % 65 bağıl nem ve 40ºC ± % 75 bağıl nem) 180 gün bekletilen resveratrol içeren lipozom formülasyonlarında resveratrol stabilitesine ait sonuçlar Tablo 4-27, Tablo 4-28 ile Şekil 4-20 ve Şekil 4-21'de gösterilmiştir.

Tablo 4-30: RSV-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları

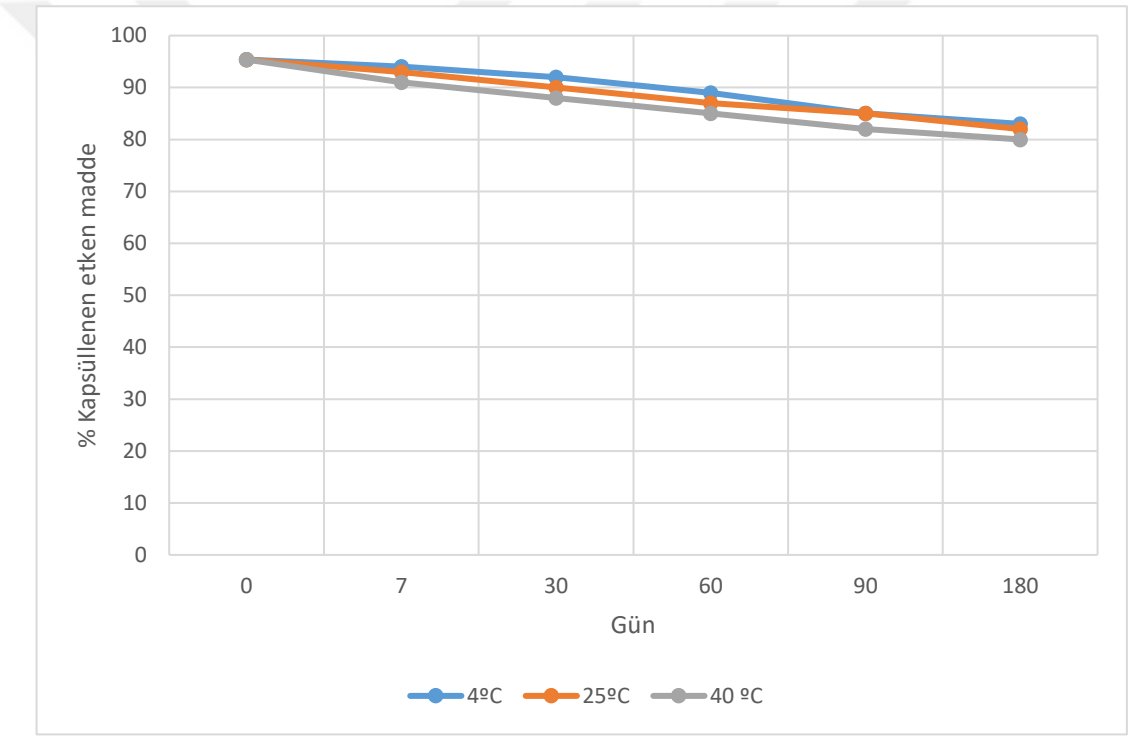
	% Kapsüllenen etken madde		
Gün	**4ºC**	**25ºC**	**40 ºC**
0	95,27 ±0,98	95,27 ±0,98	95,27 ±0,98
7	94,19 ±1,02	93,35 ±0,63	92,75 ±1,07
30	90,25 ±1,05	89,64 ±0,85	85,68 ±0,97
60	85,18 ±0,96	79,71 ±0,96	76,94 ±1,05
90	80,11 ±0,62	73,67 ±1,01	72,67 ±0,75
180	75,28 ±0,53	70,64 ±0,78	68,03 ±0,93



Şekil 4-30: RSV-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları

Tablo 4-31: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları

	% Kapsüllenen etken madde		
Gün	**4ºC**	**25ºC**	**40 ºC**
0	94,97 ±0,85	94,97 ±0,85	94,97 ±0,85
7	94,29 ±0,92	93,63 ±1,04	91,75 ±1,15
30	92,66 ±0,65	90,17 ±0,75	88,39 ±0,73
60	89,85 ±0,72	87,24 ±1,03	85,99 ±0,92
90	85,37 ±1,16	85,99 ±1,01	82,36 ±0,99
180	83,85 ±1,03	82,65 ±0,54	80,08 ±0,82



Şekil 4-31: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen resveratrol miktarları

4.5.6.2. Lipozomlarda Hapsedilen Koenzim Q10 Miktar Tayini

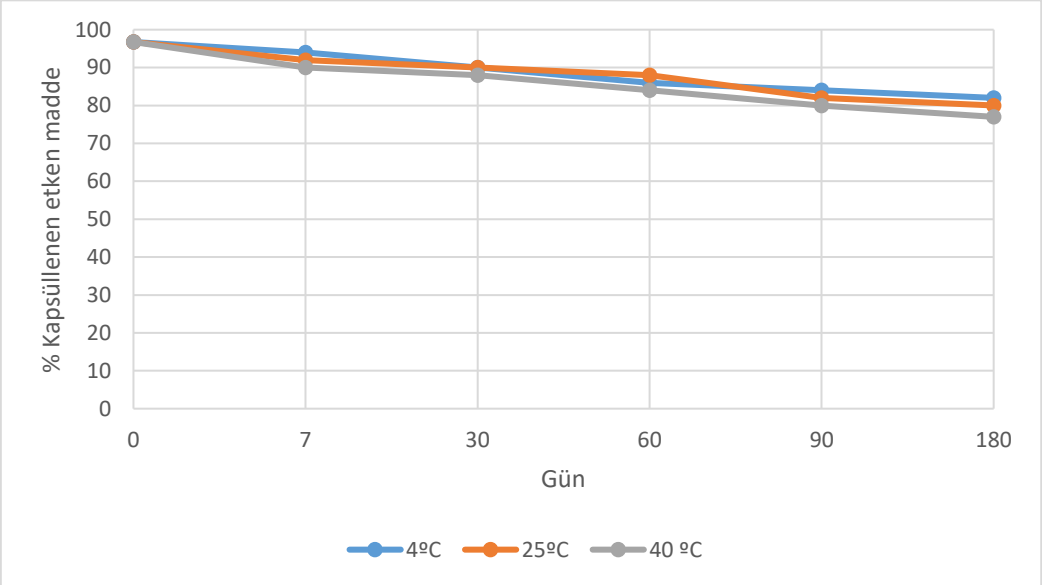
Lipozom formülasyonlarındaki aktif bileşen miktarı, Bölüm 3.2.4'te tarif edildiği gibi koenzim Q10 için HPLC ile belirlendi. Sadece koenzim Q10 içeren lipozomlarda, lipozom içine hapsedilen koenzim Q10 miktarı ortalama % 96,751

olarak hesaplanmıştır. RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki hapsedilen koenzim Q10 miktarı ortalama % 95,885 olarak hesaplanmıştır.

Farklı saklama koşullarında (4ºC, 25ºC ± % 65 bağıl nem ve 40ºC ± % 75 bağıl nem) 180 gün bekletilen koenzim Q10 içeren lipozom formülasyonlarında koenzim Q10 stabilitesine ait sonuçlar Tablo 4-29, Tablo 4-30 ile Şekil 4-22 ve Şekil 4-23'te gösterilmiştir.

Tablo 4-32: KoQ10-Lipozom'lardaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları

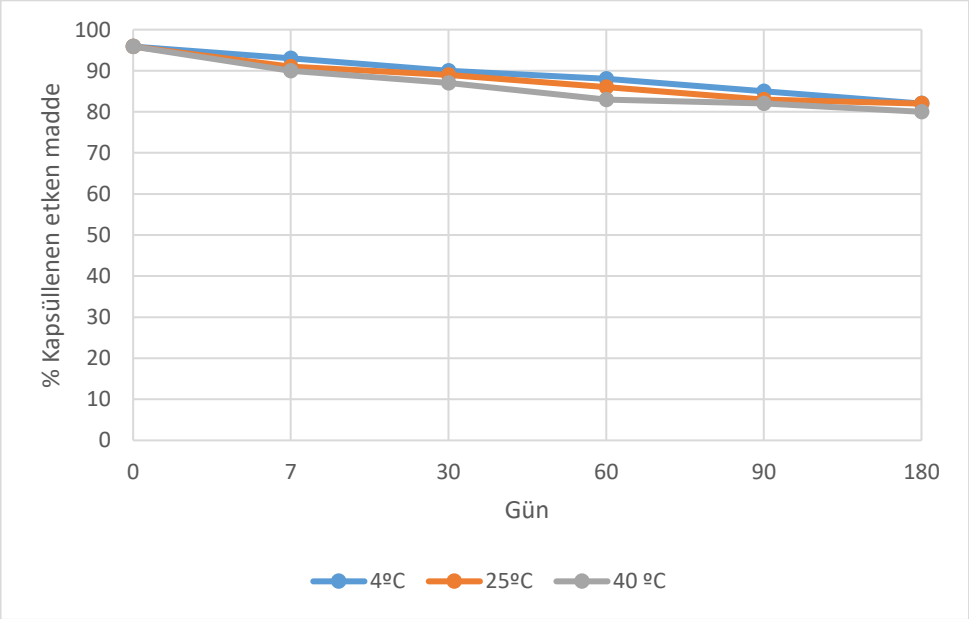
	% Kapsüllenen etken madde		
Gün	**4ºC**	**25ºC**	**40 ºC**
0	96,75 ±1,06	96,75 ±1,06	96,75 ±1,06
7	94,32 ±0,96	92,77 ±0,80	90,46 ±0,72
30	90,75 ±1,25	90,24 ±0,99	88,36 ±1,52
60	86,73 ±0,80	88,75 ±1,02	84,97 ±0,98
90	84,26 ±0,95	82,36 ±0,96	80,86 ±1,20
180	82,96 ±1,00	80,94 ±0,99	77,66 ±0,75



Şekil 4-32: KoQ10-Lipozom'lardaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları

Tablo 4-33: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları

	% Kapsüllenen etken madde		
Gün	**4ºC**	**25ºC**	**40 ºC**
0	95,88 ±0,75	95,88 ±0,75	95,88 ±0,75
7	93,67 ±0,92	91,75 ±0,98	90,47 ±1,20
30	90,75 ±0,88	89,44 ±1,76	87,23 ±0,85
60	88,75 ±0,99	86,74 ±0,88	83,74 ±1,26
90	85,46 ±1,56	83,12 ±0,45	82,58 ±1,45
180	82,95 ±1,85	82,15 ±1,36	80,04 ±0,98



Şekil 4-33: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen koenzim Q10 miktarları

4.5.6.3. Lipozomlarda Hapsedilen Vitamin E Miktar Tayini

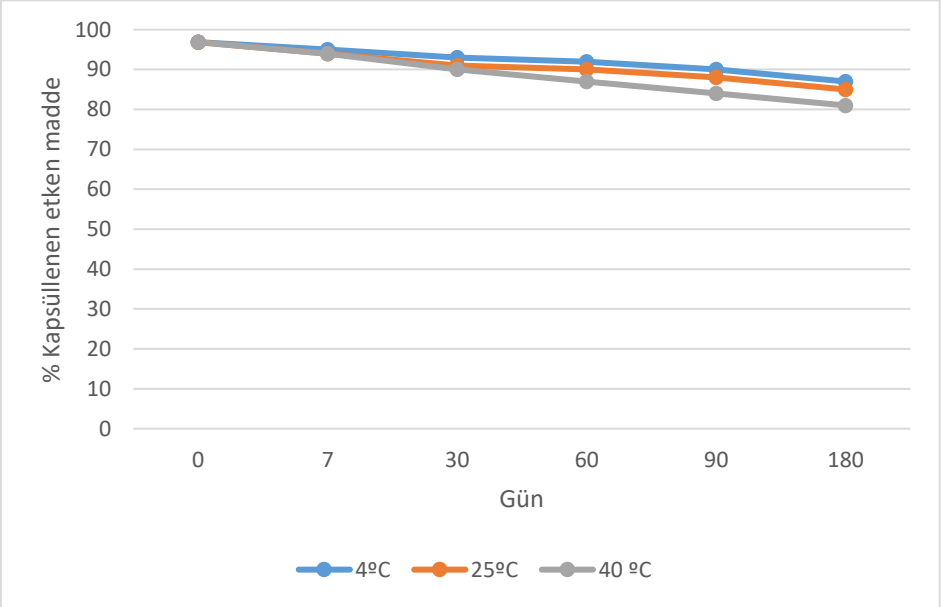
Lipozom formülasyonlarındaki aktif bileşen miktarı, Bölüm 3.2.7'de tarif edildiği gibi vitamin E için HPLC ile belirlendi. Sadece vitamin E içeren lipozomlarda, lipozom içine hapsedilen vitamin E miktarı ortalama %96,863 olarak

hesaplanmıştır. RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki hapsedilen vitamin E miktarı ortalama %95,633 olarak hesaplanmıştır.

Farklı saklama koşullarında (4ºC, 25ºC ± % 65 bağıl nem ve 40ºC ± % 75 bağıl nem) 180 gün bekletilen vitamin E içeren lipozom formülasyonlarında vitamin E stabilitesine ait sonuçlar Tablo 4-31, Tablo 4-32 ile Şekil 4-24 ve Şekil 4-25'te gösterilmiştir.

Tablo 4-34: VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları

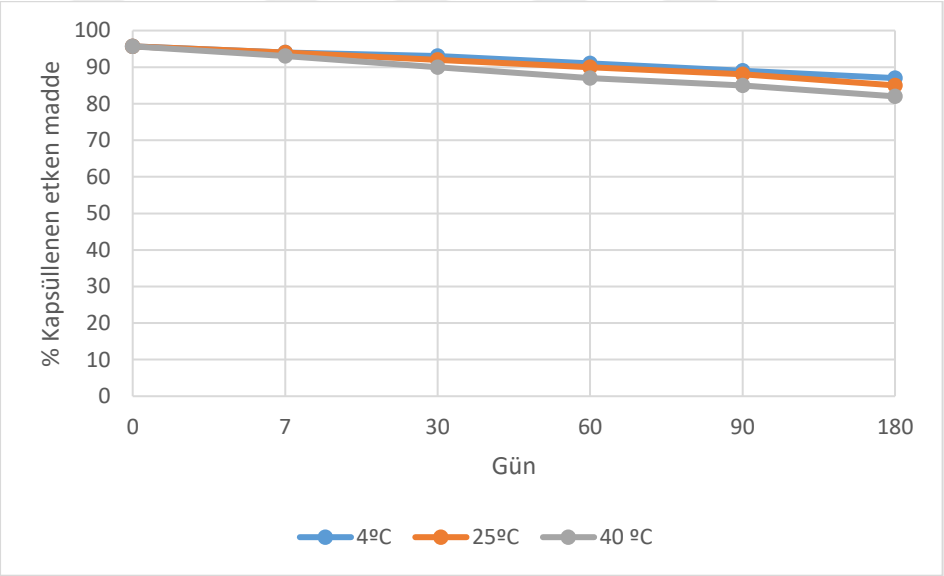
	% Kapsüllenen etken madde		
Gün	**4ºC**	**25ºC**	**40 ºC**
0	96,86 ±0,92	96,86 ±0,92	96,86 ±0,92
7	95,75 ±0,76	94,58 ±0,55	94,46 ±1,85
30	93,35 ±1,22	91,93 ±0,76	90,36 ±0,98
60	92,63 ±0,92	90,58 ±0,65	87,39 ±0,99
90	90,47 ±1,65	88,68 ±1,55	84,91 ±1,25
180	87,37 ±1,42	85,32 ±1,82	81,45 ±0,75



Şekil 4-34: VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları

Tablo 4-35: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları

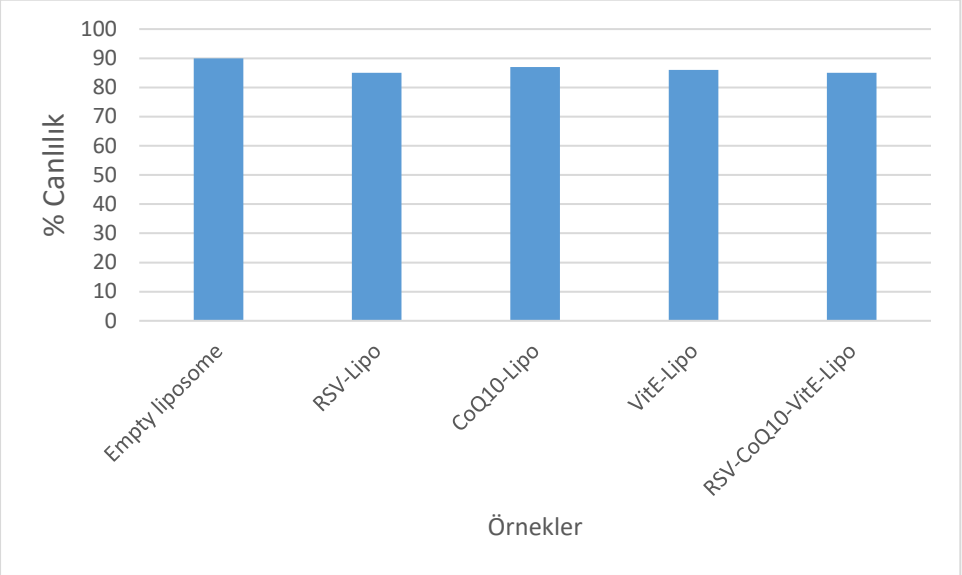
	% Kapsüllenen etken madde		
Gün	**4ºC**	**25ºC**	**40 ºC**
0	95,63 ±0,55	95,63 ±0,55	95,63 ±0,55
7	94,62 ±0,82	94,12 ±1,55	93,37 ±0,70
30	93,35 ±0,99	92,19 ±1,02	90,26 ±1,25
60	91,64 ±0,78	90,71 ±0,95	87,72 ±0,36
90	89,99 ±1,05	88,27 ±0,44	85,84 ±0,97
180	87,94 ±0,85	85,89 ±0,20	82,36 ±1,09



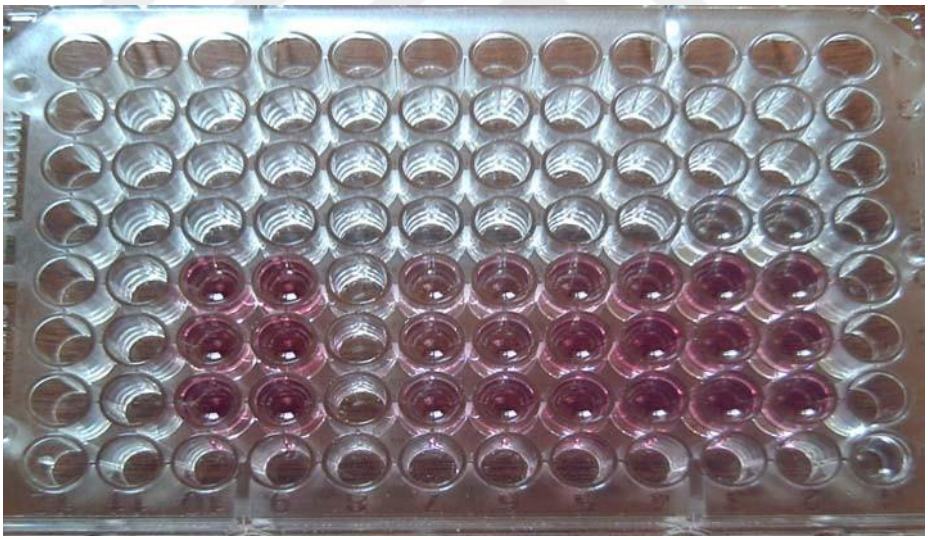
Şekil 4-35: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom'larındaki % kapsüllenen vitamin E miktarları

4.5.7. Lipozomlara Ait Sitotoksisite Analizi Bulguları

MTT testi Yöntem 3.2.10'da belirtildiği şekilde yapılmıştır. Lipozom formülasyonlarının uygulandığı L929 fare fibroblast hücrelerindeki hücre canlılığı Şekil 4-27'de gösterilmiştir.



Şekil 4-36: Lipozom formülasyonlarının L929 fare fibroblast hücre hattındakitoksisitesi (n=3)



Şekil 4-37: MTT testi plakası örneği

4.5.8. In vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

RSV-Lipozom, VitE-Lipozom, KoQ10-Lipozom ve RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonları ile resveratrol, koenzim Q10, vitamin E içeren kremin in vitro geçişi analiz edildi, hazırlanan formülasyonların salım çalışmaları Franzcell

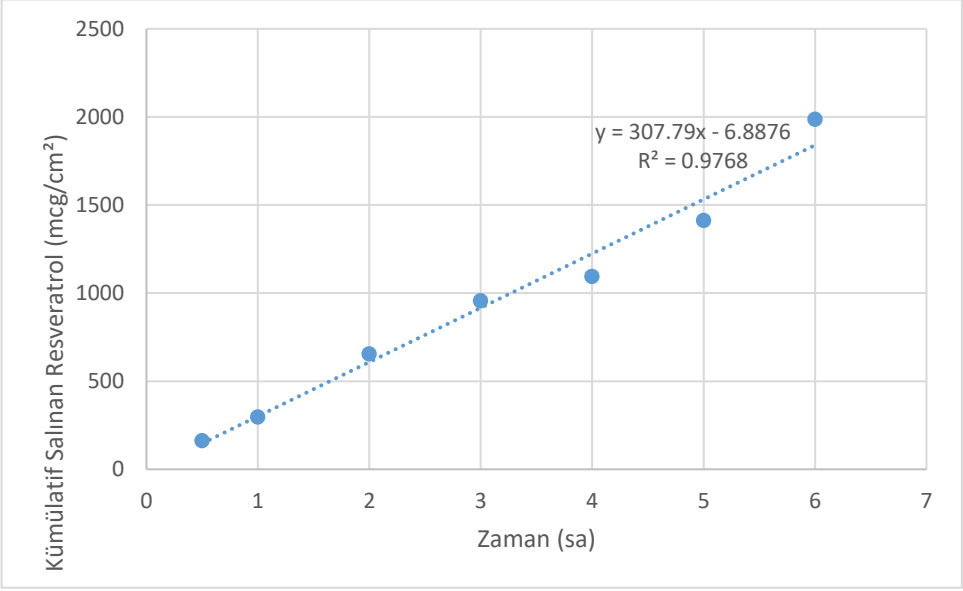
yöntemi kullanılarak yapıldı ve etken madde miktarının birim zamandaki grafikleri yapay membran ve domuz derisinden geçiş için gösterildi.

4.5.8.1. Resveratrolün in vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

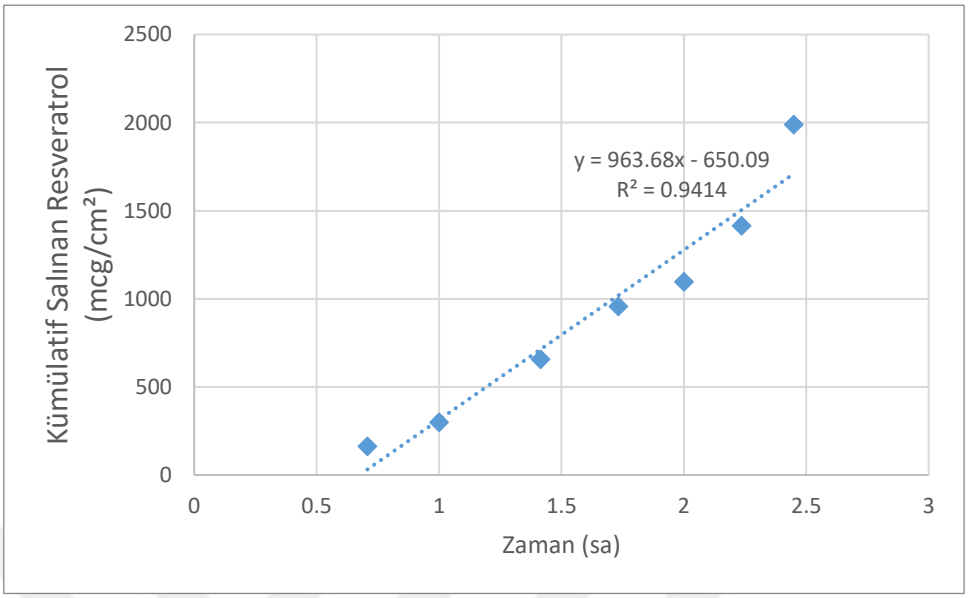
RSV-Lipozom, RSV-KoQ10-VitE-Lipozom ve krem formülasyonlarının yapay membrandan ve domuz derisinden geçen resveratrol miktarı Tablo 4-33, 4-34,4-35, 4-36, 4-37, 4-38 ile Şekil 4-29, 4-30, 4-31, 4-32, 4-33, 4-34'te gösterilmiştir.

Tablo 4-36: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	192,593	166,649	127,384	162,2087	32,83049	20,23966
1	311,878	289,743	292,474	298,0317	12,06877	4,049494
2	687,482	602,645	675,737	655,288	45,96684	7,014754
3	978,373	941,568	950,469	956,8033	19,20273	2,006967
4	1145,679	1043,568	1096,468	1095,238	51,0666	4,662602
5	1544,459	1336,829	1358,913	1413,4	114,036	8,068202
6	2032,468	1944,743	1987,468	1988,226	43,86742	2,206359



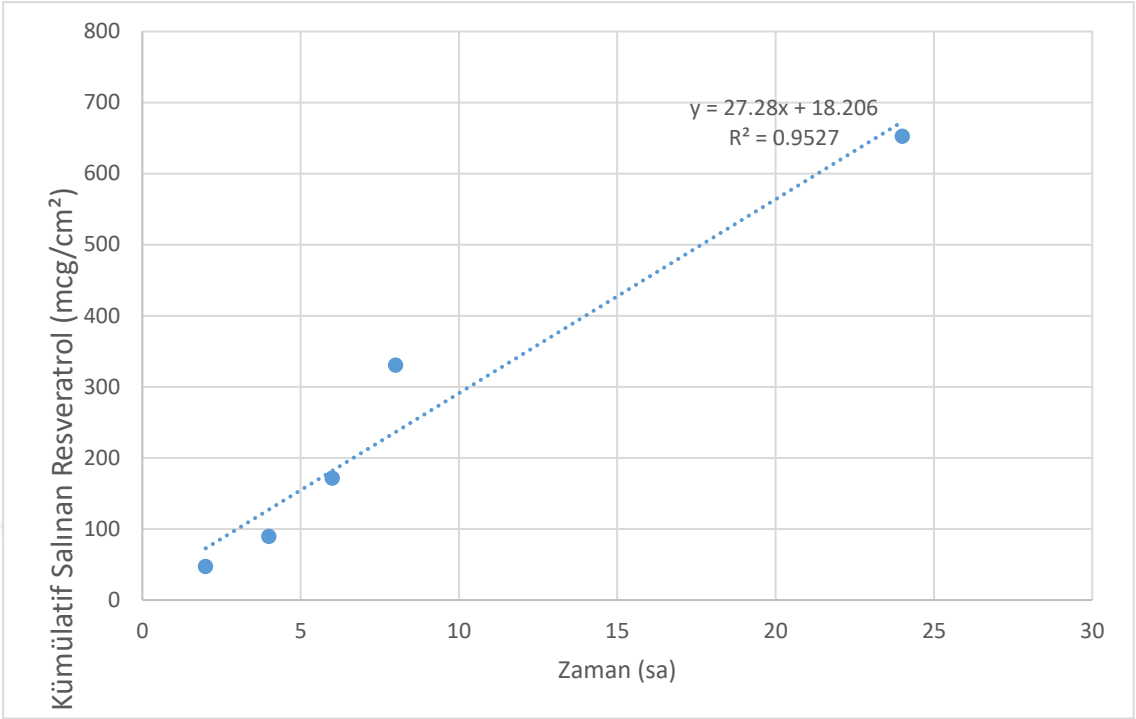
Şekil 4-38: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



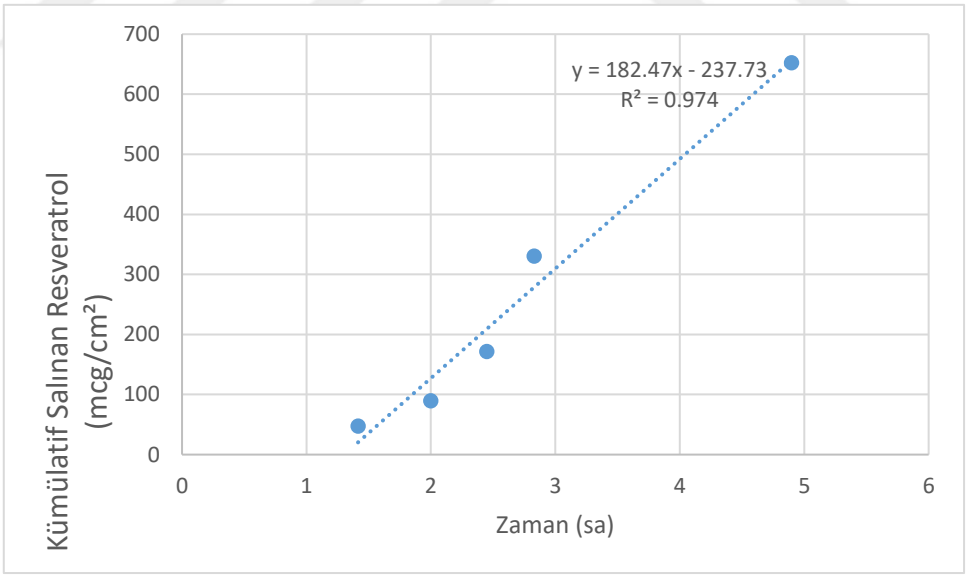
Şekil 4-39: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-37: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	47,968	45,472	48,159	47,19967	1,499248	3,176395
4	81,148	88,83	99,284	89,754	9,103239	10,14243
6	166,976	172,465	174,762	171,401	4,000565	2,334038
8	315,368	339,468	336,273	330,3697	13,08967	3,962129
24	669,797	645,461	642,672	652,6433	14,92082	2,286213



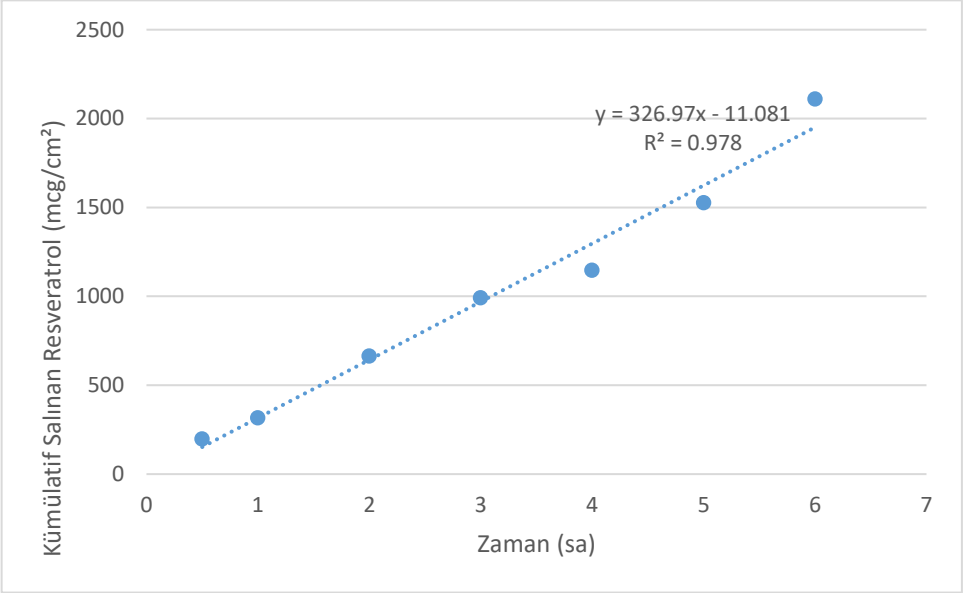
Şekil 4-40: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



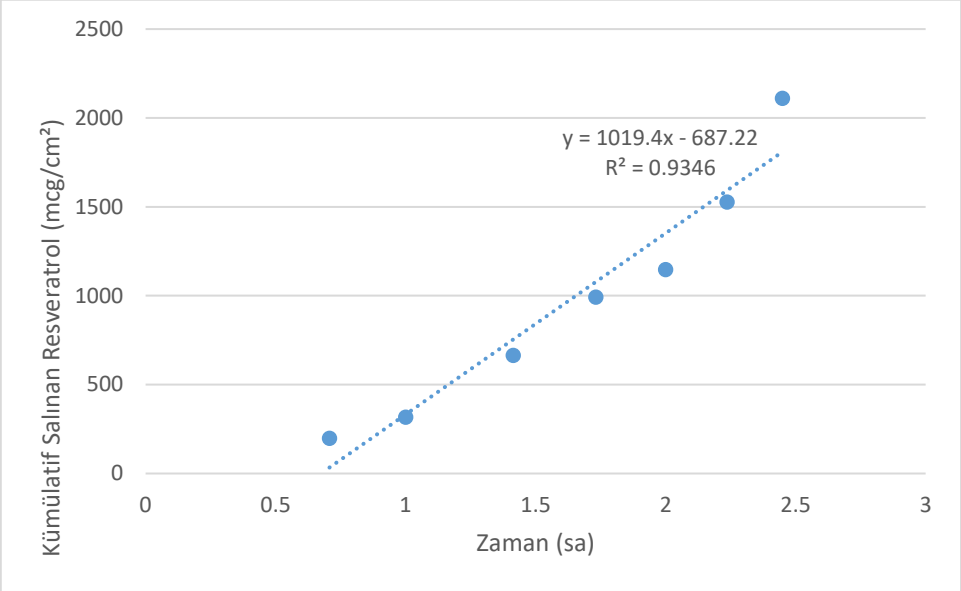
Şekil 4-41: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-38: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	199,746	195,758	198,014	197,8393333	1,999729	1,010784
1	298,838	341,657	308,345	316,28	22,48533	7,10931
2	678,457	684,234	628,033	663,5746667	30,91522	4,658891
3	988,373	976,894	1007,647	990,9713333	15,54028	1,568186
4	1146,246	1143,843	1149,578	1146,555667	2,880013	0,251188
5	1598,764	1396,364	1583,721	1526,283	112,7643	7,388163
6	2149,485	1987,476	2195,676	2110,879	109,3372	5,179701



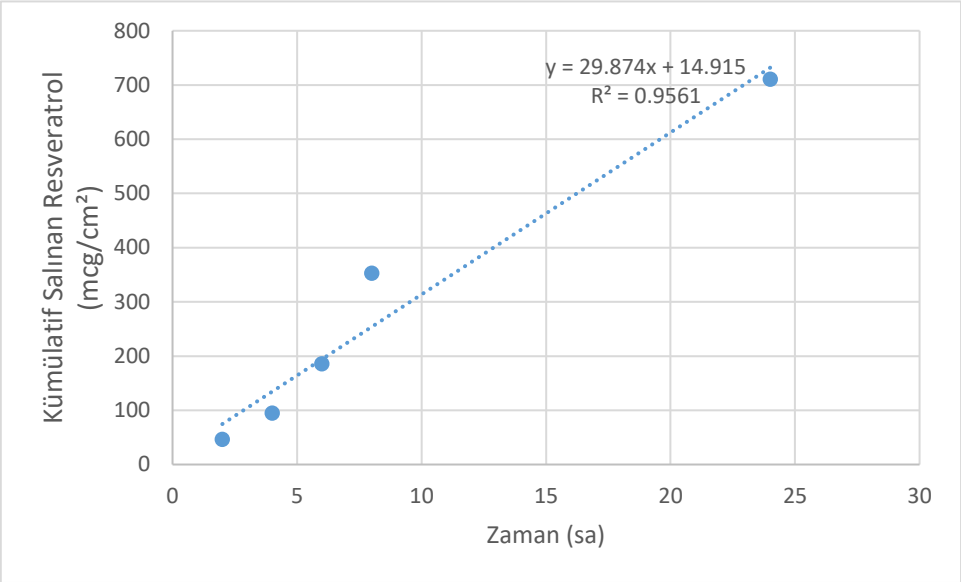
Şekil 4-42: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili



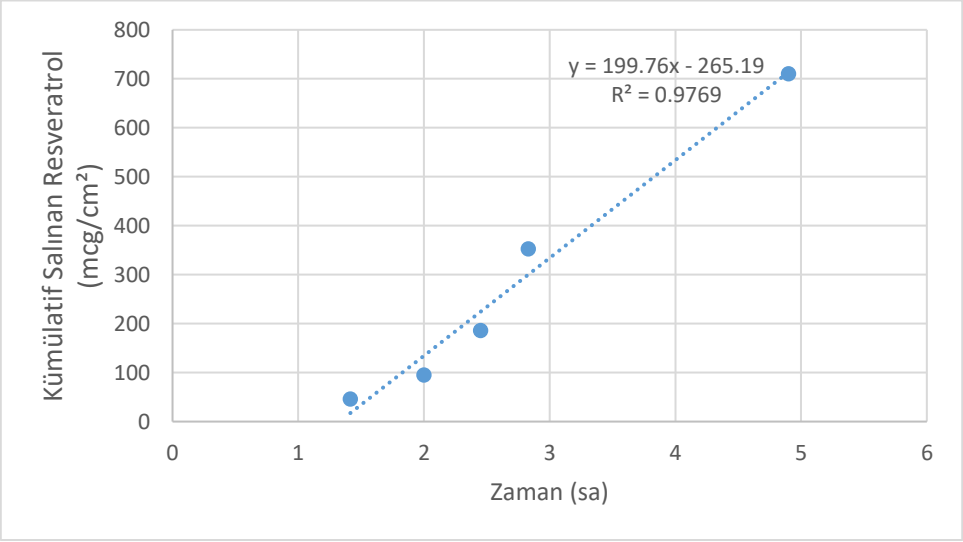
Şekil 4-43: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-39: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	43,016	44,736	50,464	46,072	3,899596	8,464134
4	88,738	89,474	105,744	94,652	9,613	10,15615
6	176,262	178,474	202,428	185,7213	14,51061	7,813108
8	348,284	343,829	365,148	352,4203	11,2453	3,190879
24	704,479	698,492	727,579	710,1833	15,35962	2,162768



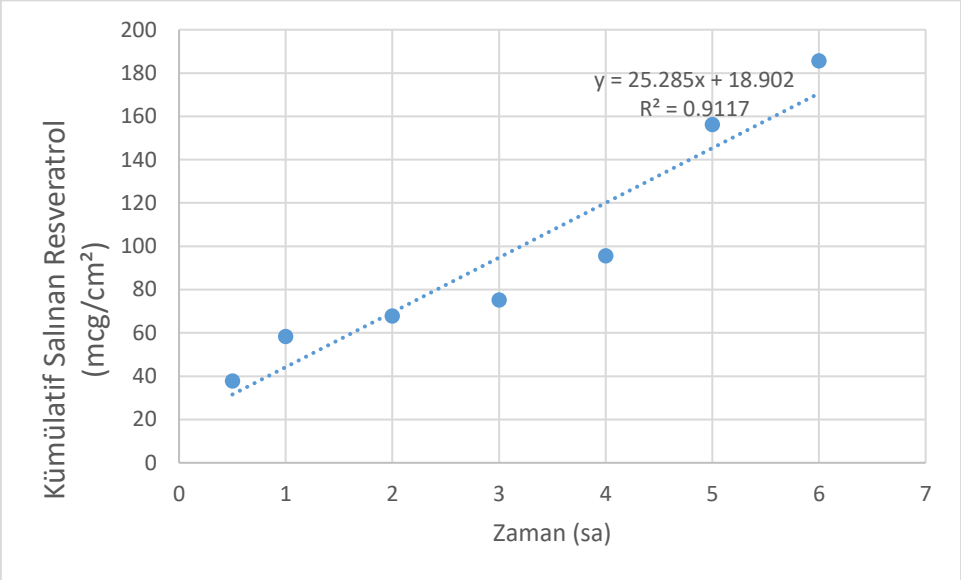
Şekil 4-44: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



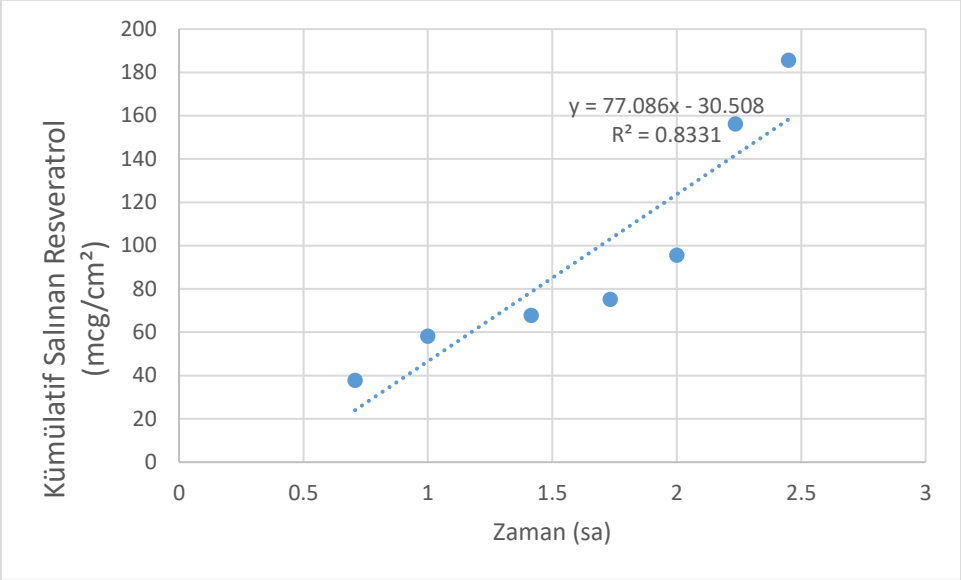
Şekil 4-45: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-40: Krem formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	36,757	44,569	31,826	37,71733	6,42555	17,03607
1	53,389	61,794	59,472	58,21833	4,34048	7,455521
2	68,695	72,937	61,479	67,70367	5,79297	8,55636
3	75,604	83,769	66,153	75,17533	8,81582	11,72701
4	92,678	94,475	99,374	95,509	3,465685	3,628647
5	160,063	157,357	150,862	156,094	4,728739	3,029418
6	188,854	172,854	194,847	185,5183	11,36961	6,128564



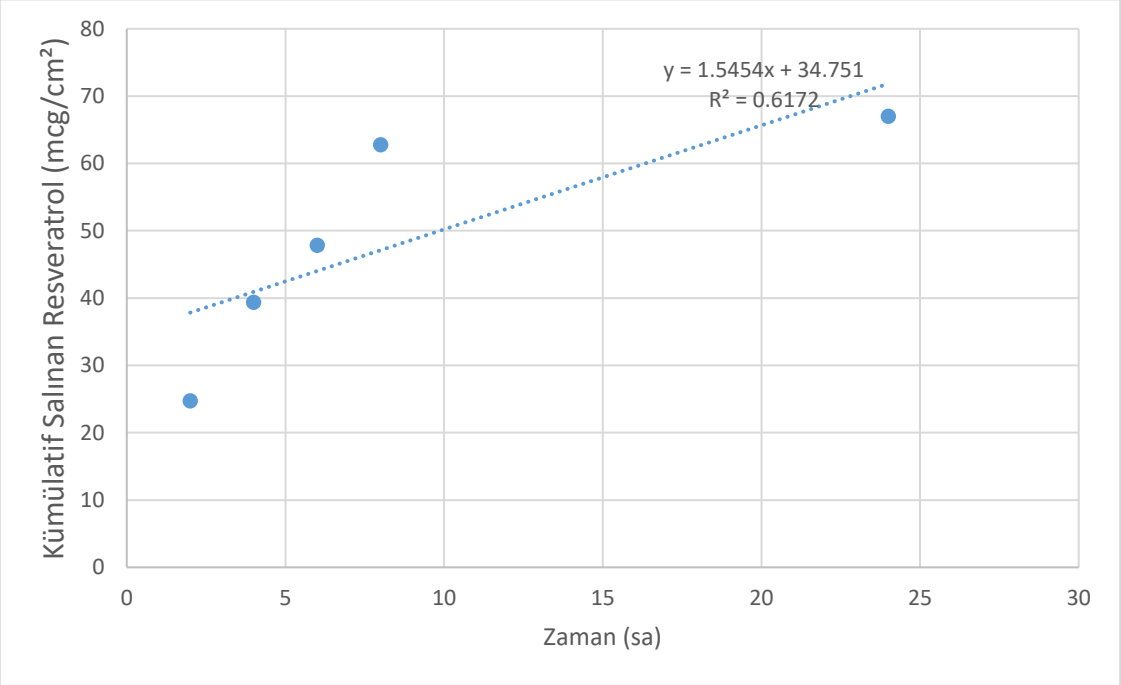
Şekil 4-46: Krem formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



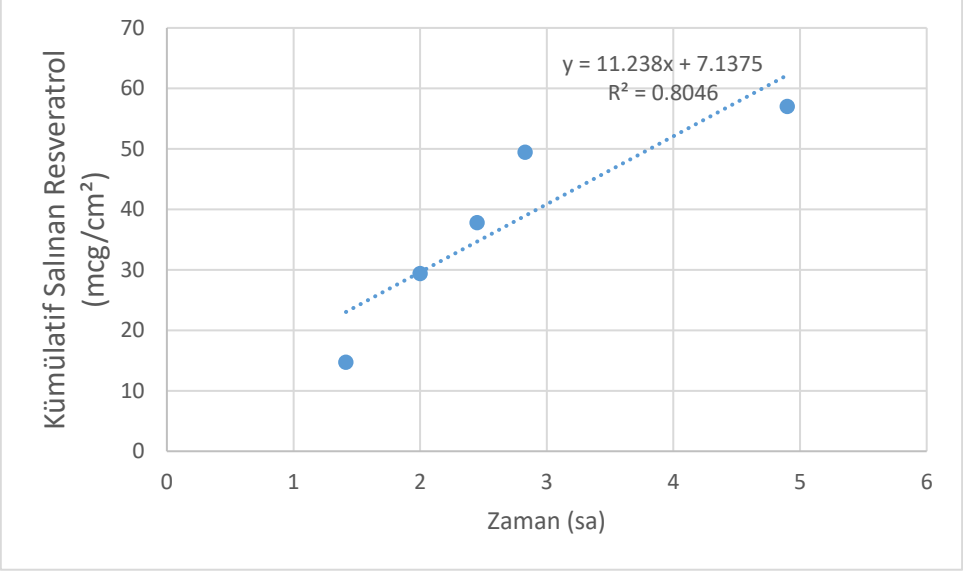
Şekil 4-47: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün yapay membrandan Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-41: Krem formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	13,957	14,579	15,684	14,74	0,874685	5,934088
4	25,589	32,893	29,681	29,38767	3,660825	12,45701
6	36,254	44,625	32,583	37,82067	6,171975	16,31905
8	47,874	56,737	43,754	49,455	6,634323	13,41487
24	52,827	59,643	58,578	57,016	3,666653	6,43092



Şekil 4-48: Krem formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



Şekil 4-49: RSV-Lipozom formülasyonundan resveratrolün domuz derisinden Higuchi kinetiğine göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-42: Resveratrolün selüloz asetat membrandan in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi

		RSV-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Krem
Fick'in Birinci Yasası	r^2	0,9768	0,978	0,9117
	k (mcg/cm^2/sa)	307,79	326,97	25,285
Higuchi Kinetik Modeli	r^2	0,9414	0,9346	0,8331
	k (mcg/cm^2/sa)	963,68	1019,4	77,086

Tablo 4-43: Resveratrolün domuz derisinden in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi

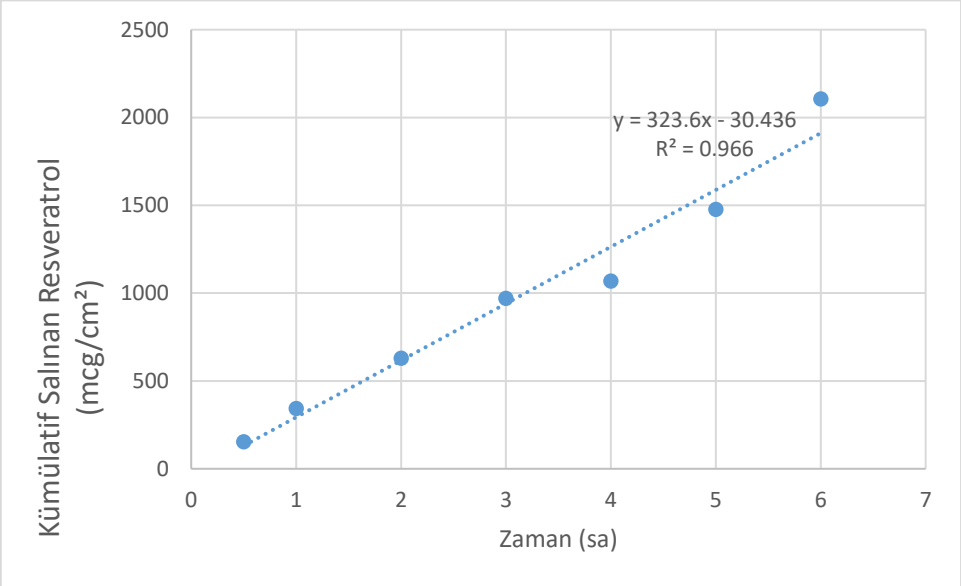
		RSV-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Krem
Fick'in Birinci Yasası	r^2	0,9527	0,9561	0,6733
	k (mcg/cm^2/sa)	27,28	29,874	1,554
Higuchi Kinetik Modeli	r^2	0,974	0,9769	0,8046
	k (mcg/cm^2/sa)	182,47	199,76	11,238

4.5.8.2. Koenzim Q10'un in vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

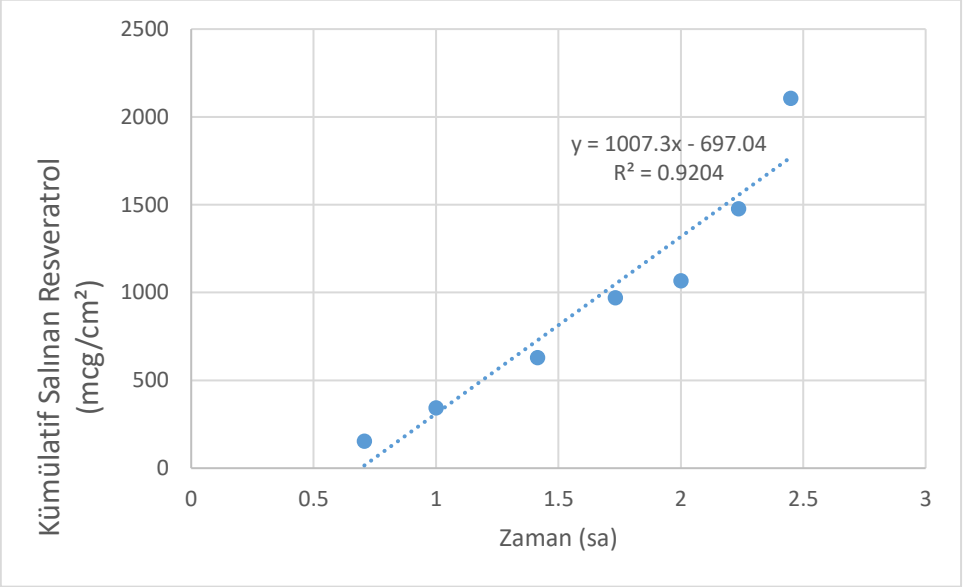
KoQ10-Lipozom, RSV-KoQ10-VitE-Lipozom ve krem formülasyonlarının yapay membrandan ve domuz derisinden geçen resveratrol miktarı Tablo 4-39, 4-40, 4-41, 4-42, 4-43, 4-44 ile Şekil 4-35, 4-36, 4-37, 4-38, 4-39, 4-40'ta gösterilmiştir.

Tablo 4-44: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	193,857	138,684	128,785	153,7753	35,06284	22,80134
1	358,294	326,584	342,617	342,4983	15,85533	4,629317
2	675,963	589,269	620,925	628,719	43,86938	6,977581
3	975,753	959,357	972,249	969,1197	8,634335	0,890946
4	1135,247	1028,963	1037,852	1067,354	58,9648	5,524391
5	1543,479	1444,853	1442,157	1476,83	57,73575	3,909439
6	2136,958	2095,486	2085,826	2106,09	27,16531	1,289846



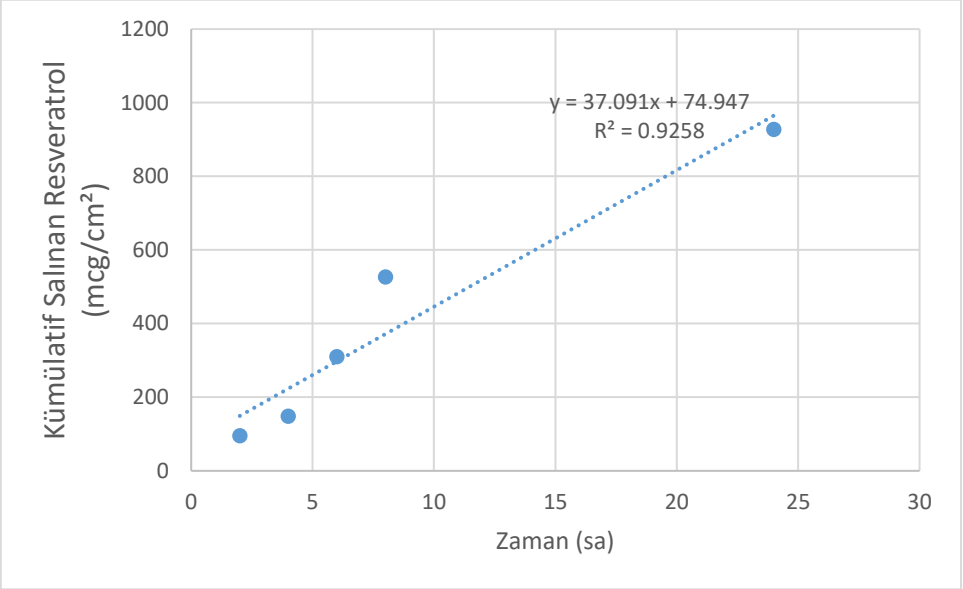
Şekil 4-50: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



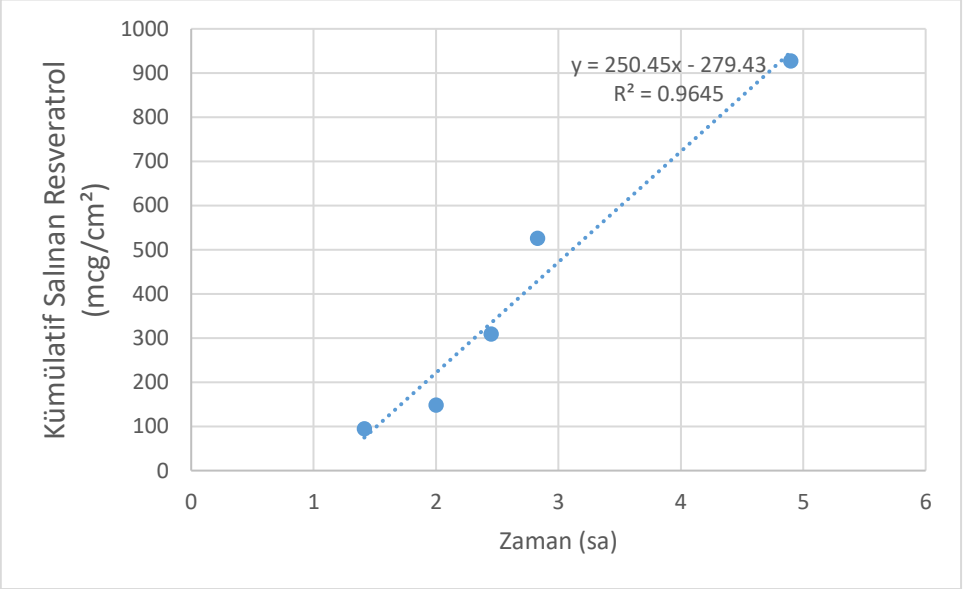
Şekil 4-51: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Higuchi kinetğine göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-45: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	88,853	91,673	104,746	95,09067	8,479811	8,917606
4	148,842	141,753	153,974	148,1897	6,13656	4,141017
6	317,369	312,963	298,247	309,5263	10,01353	3,235113
8	542,453	526,328	510,269	526,35	16,09201	3,057283
24	920,285	956,642	905,863	927,5967	26,16719	2,820967



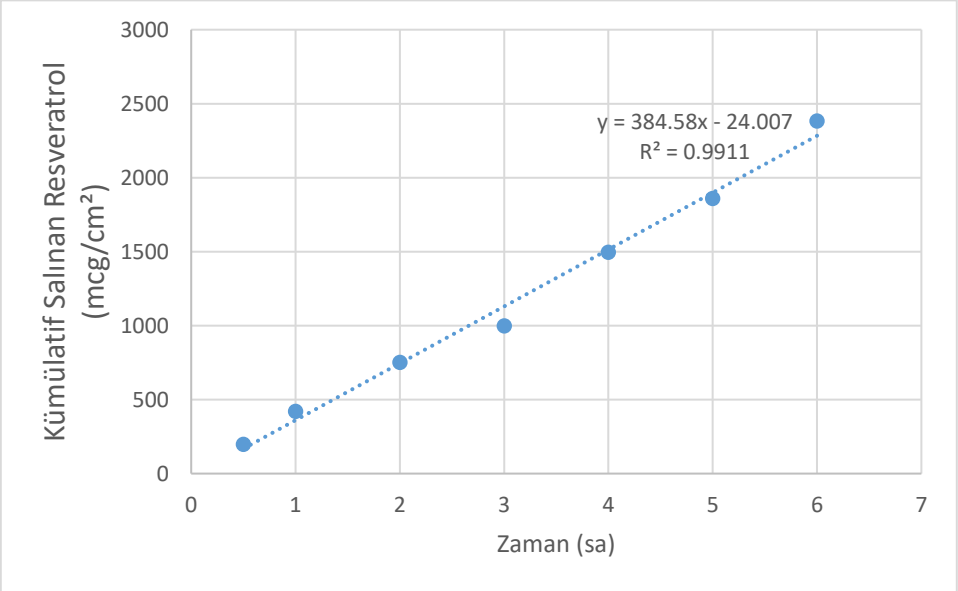
Şekil 4-52: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



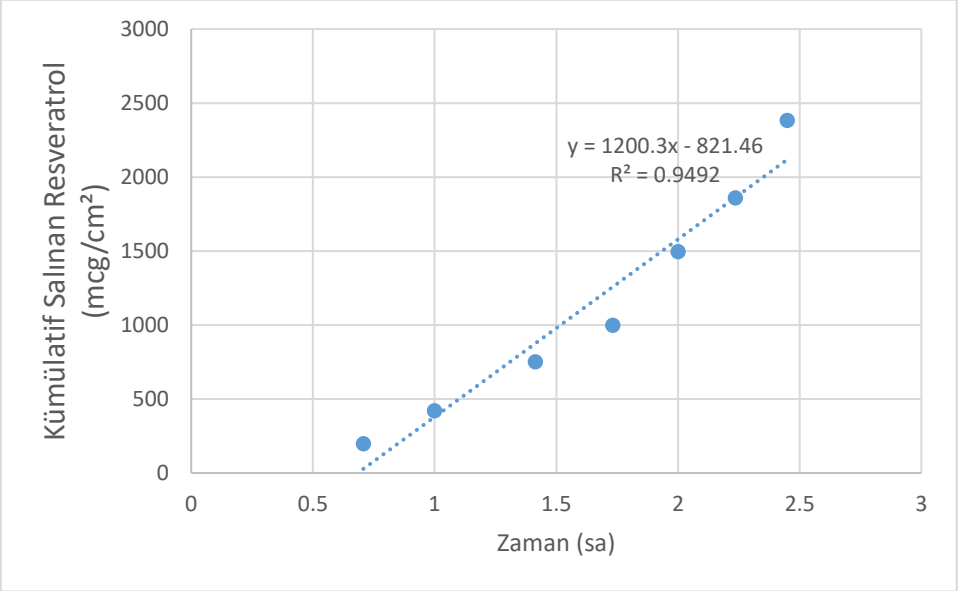
Şekil 4-53: KoQ10-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-46: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	195,863	203,953	194,536	198,1173	5,097204	2,572821
1	432,785	403,925	420,638	419,116	14,49007	3,457295
2	778,469	775,485	696,653	750,2023	46,39908	6,184875
3	1025,725	1023,539	942,725	997,3297	47,30166	4,742831
4	1575,876	1582,457	1324,837	1494,39	146,8741	9,828363
5	1891,749	1890,384	1794,639	1858,924	55,67663	2,9951
6	2467,736	2475,662	2203,585	2382,328	154,8464	6,499795



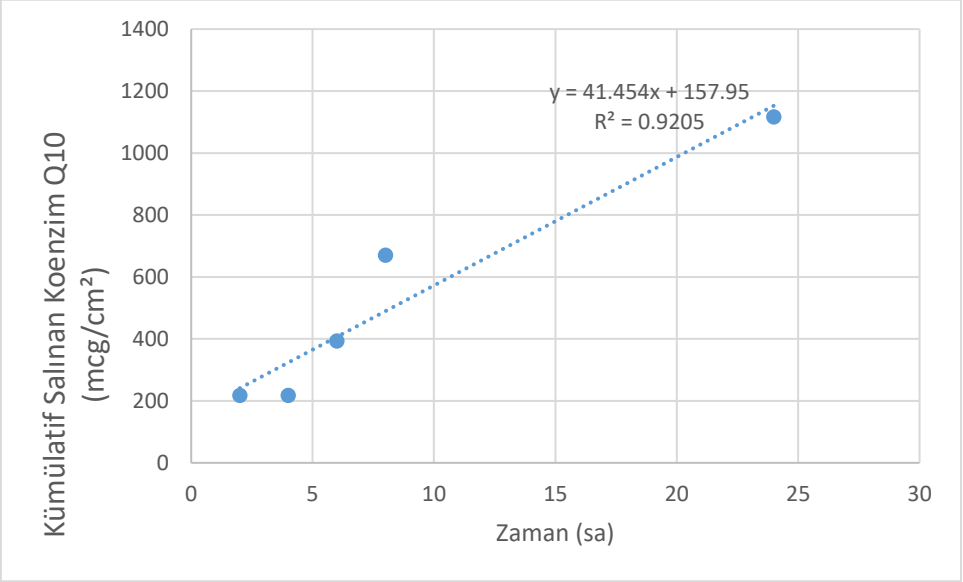
Şekil 4-54: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



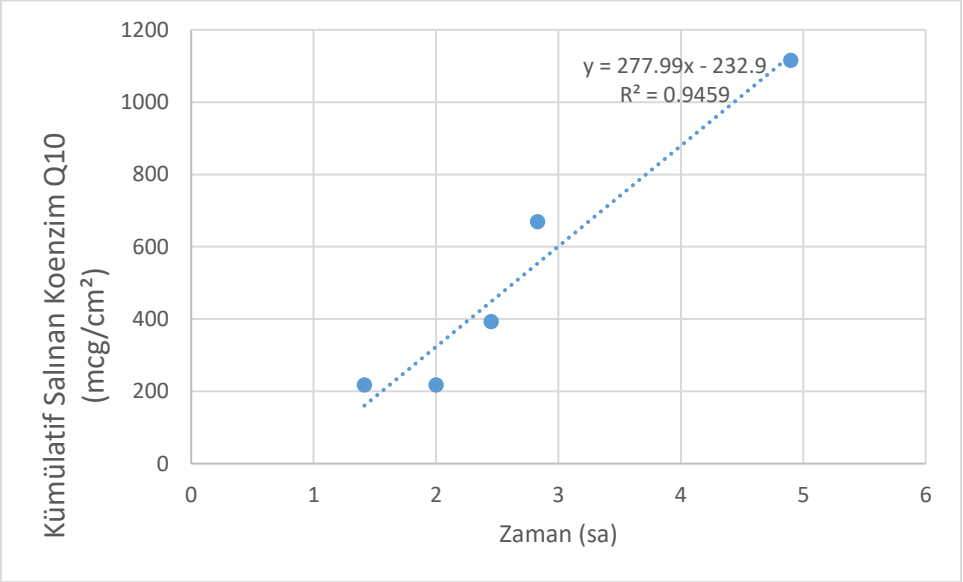
Şekil 4-55: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-47: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	108,964	102,594	116,384	109,314	6,901659	6,313609
4	215,786	197,474	239,638	217,6327	21,14257	9,714797
6	393,375	385,457	399,683	392,8383	7,128168	1,814530
8	678,538	636,274	694,378	669,73	30,03672	4,484899
24	1096,489	1052,768	1198,373	1115,877	74,71355	6,695503



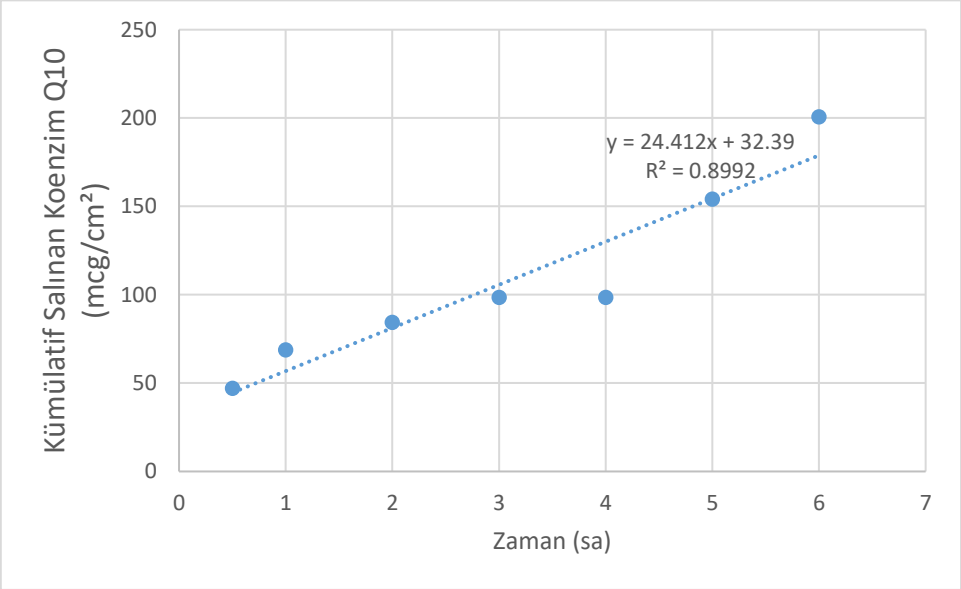
Şekil 4-56: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



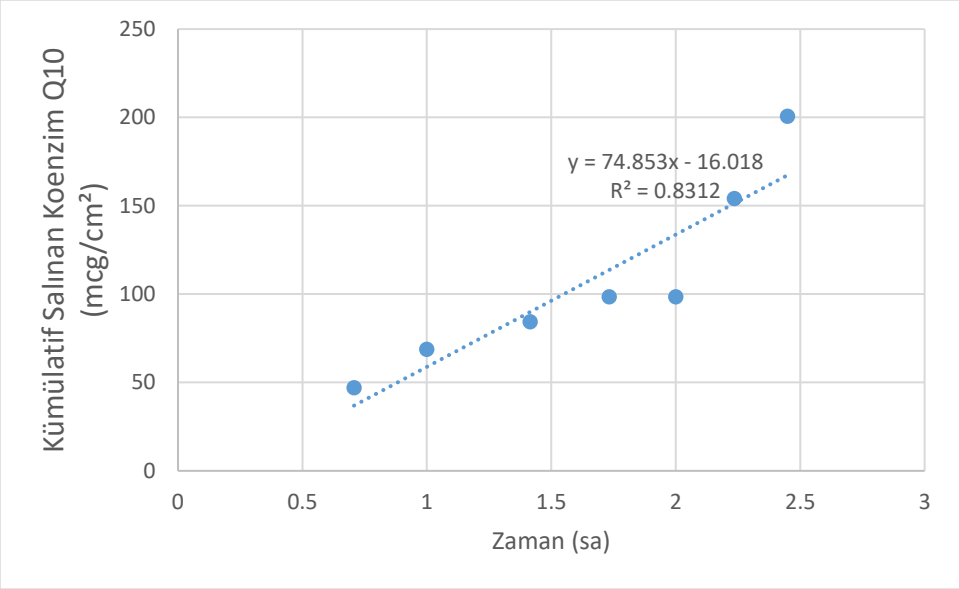
Şekil 4-57: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-48: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	48,638	43,583	48,637	46,95267	2,918217	6,215232
1	68,395	65,026	72,792	68,73767	3,894323	5,665487
2	89,479	76,285	87,316	84,36	7,076289	8,388204
3	102,842	94,286	98,185	98,43767	4,283592	4,351579
4	143,826	137,488	140,396	140,57	3,172580	2,256940
5	158,362	149,962	153,673	153,999	4,209478	2,733445
6	206,362	195,962	199,673	200,6657	5,270583	2,626549



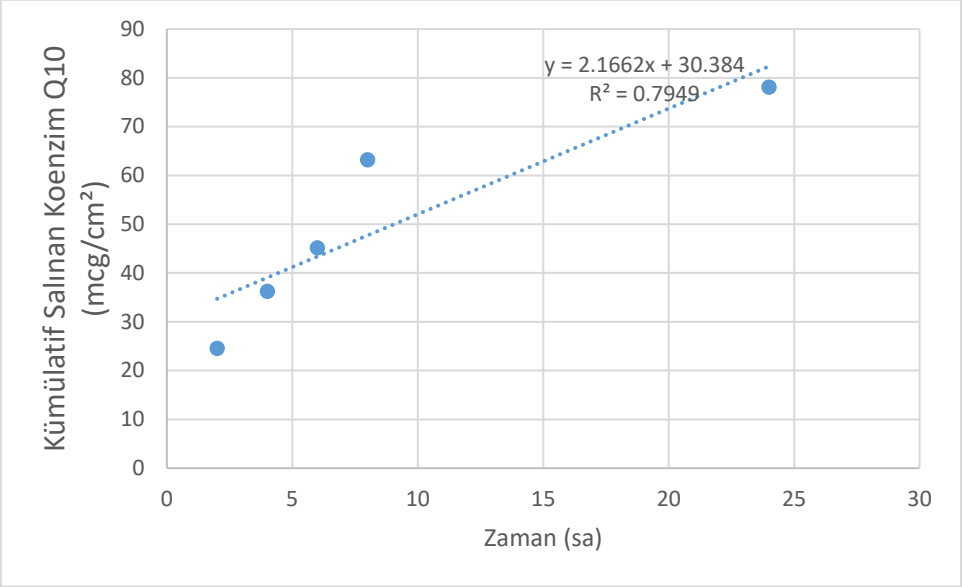
Şekil 4-58: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



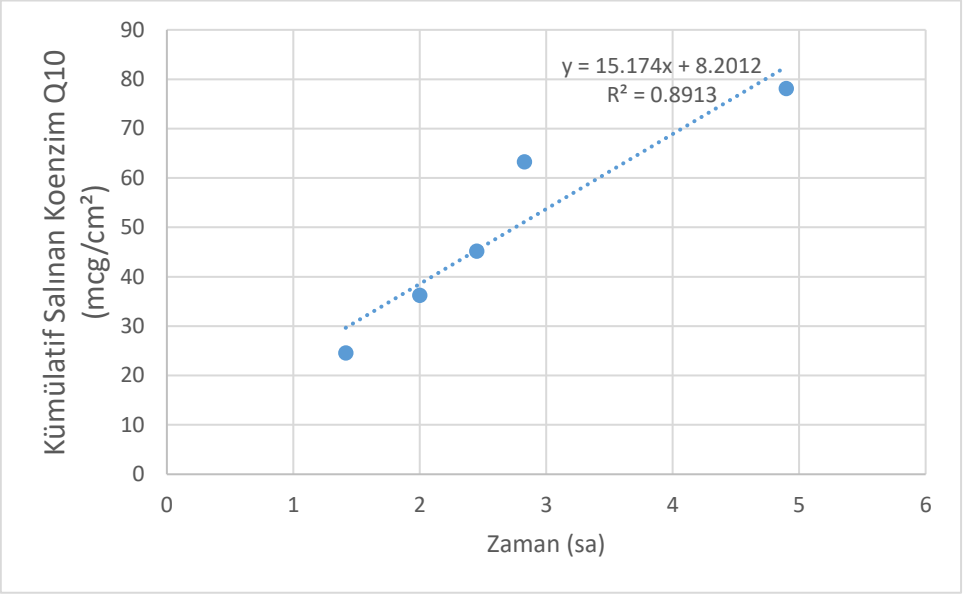
Şekil 4-59: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-49: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	24,258	20,984	28,389	24,54367	3,710756	15,119
4	36,397	33,865	38,397	36,21967	2,271198	6,270622
6	47,297	45,229	42,985	45,17033	2,156599	4,774369
8	63,875	60,926	64,874	63,225	2,052694	3,246649
24	78,586	75,754	79,882	78,074	2,111091	2,703961



Şekil 4-60: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



Şekil 4-61: Krem formülasyonundan Koenzim Q10'un domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-50: Koenzim Q10'un selüloz asetat membrandan in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi

		CoQ10-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Krem
Fick'in Birinci Yasası	r^2	0,966	0,9911	0,8992
	k (mcg/cm^2/sa)	323,6	384,58	24,412
Higuchi Kinetik Modeli	r^2	0,9204	0,9492	0,8312
	k (mcg/cm^2/sa)	1007,3	1200,3	74,853

Tablo 4-51: Koenzim Q10'un domuz derisinden in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi

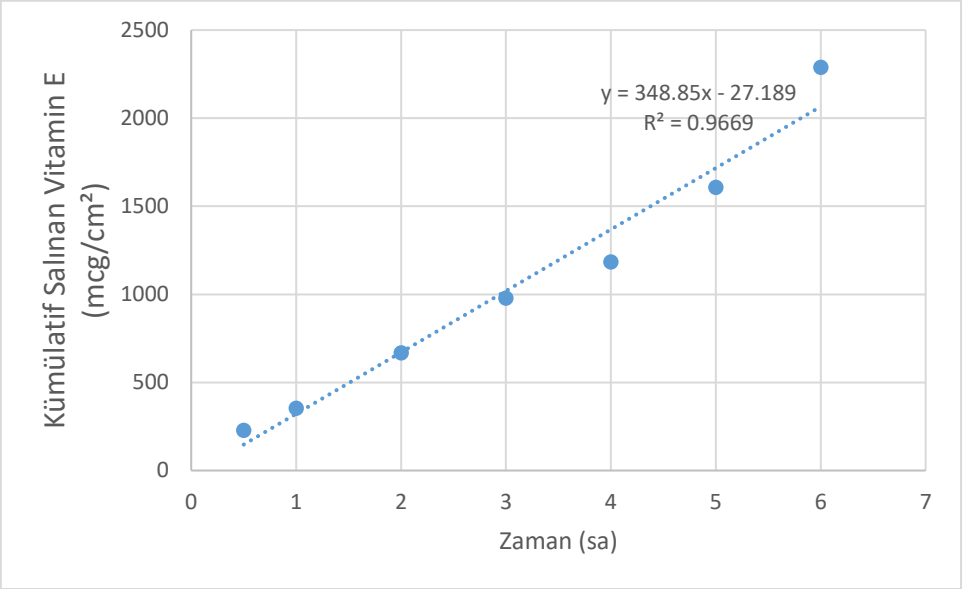
		RSV-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Krem
Fick'in Birinci Yasası	r^2	0,9258	0,9205	0,7949
	k (mcg/cm^2/sa)	37,091	41,454	2,1662
Higuchi Kinetik Modeli	r^2	0,9645	0,9459	0,8913
	k (mcg/cm^2/sa)	250,45	277,99	15,174

4.5.8.3. Vitamin E'nin in vitro Geçiş Çalışmalarına Ait Bulgular

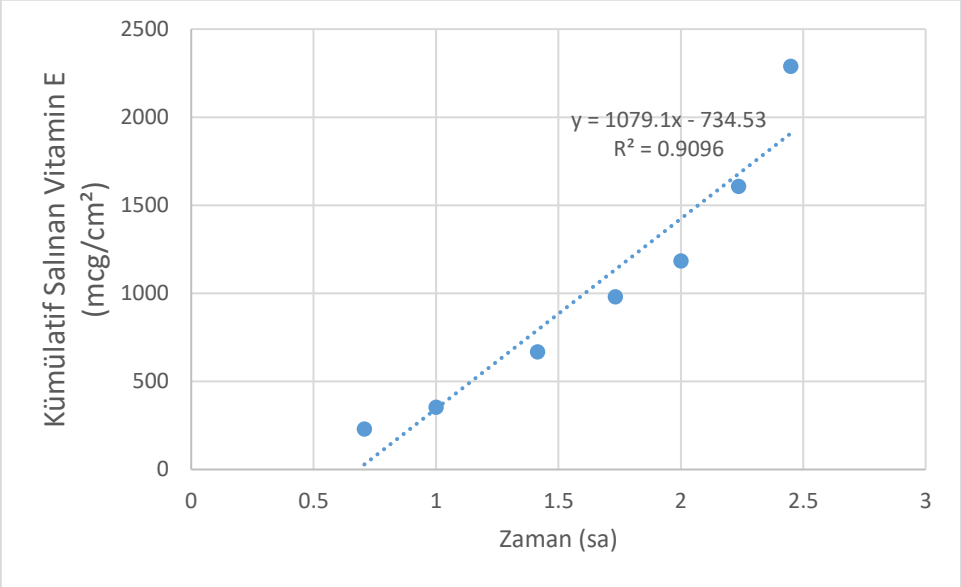
VitE-Lipozom, RSV-KoQ10-VitE-Lipozom ve krem formülasyonlarının yapay membrandan ve domuz derisinden geçen resveratrol miktarı Tablo 4-52, 4-53, 4-54, 4-55, 4-56, 4-57 ile Şekil 4-41, 4-42, 4-43, 4-44, 4-45, 4-46'da gösterilmiştir.

Tablo 4-52: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	228,951	225,368	232,985	229,1013	3,810725	1,663336
1	352,865	340,124	367,264	353,4177	13,57844	3,842037
2	673,757	642,163	687,374	667,7647	23,19353	3,473308
3	985,287	934,864	1018,365	979,5053	42,04967	4,29295
4	1155,211	1142,726	1253,452	1183,796	60,64571	5,122986
5	1603,649	1593,948	1624,273	1607,29	15,4869	0,963541
6	2295,686	2238,599	2332,758	2289,014	47,43272	2,07219



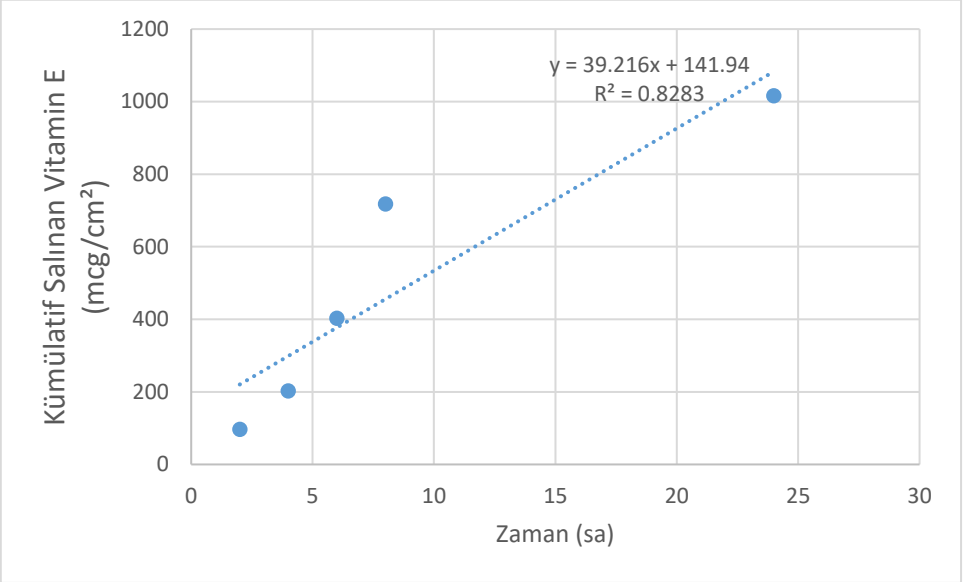
Şekil 4-62: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



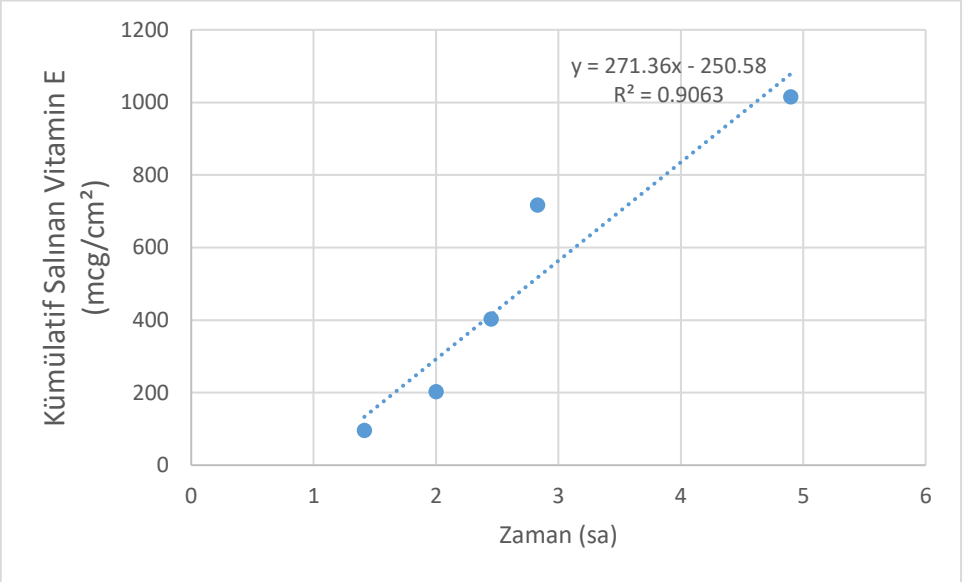
Şekil 4-63: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-53: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	96,286	92,492	100,273	96,35033	3,890899	4,038283
4	203,875	198,281	205,194	202,45	3,670199	1,812892
6	405,129	392,841	411,365	403,1117	9,425331	2,338144
8	718,375	693,457	740,738	717,5233	23,652	3,296339
24	1002,286	1028,335	1016,635	1015,752	13,04693	1,28446



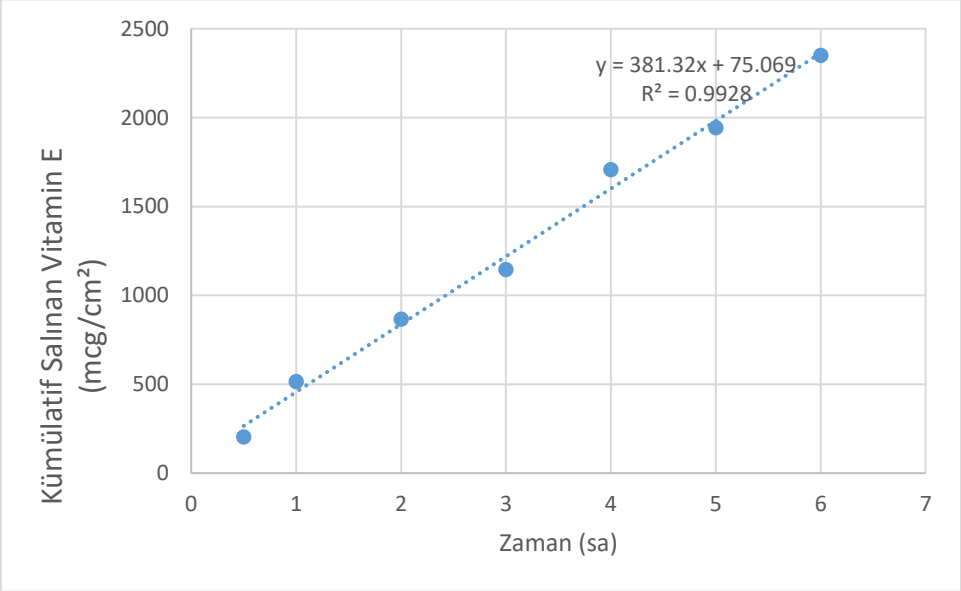
Şekil 4-64: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



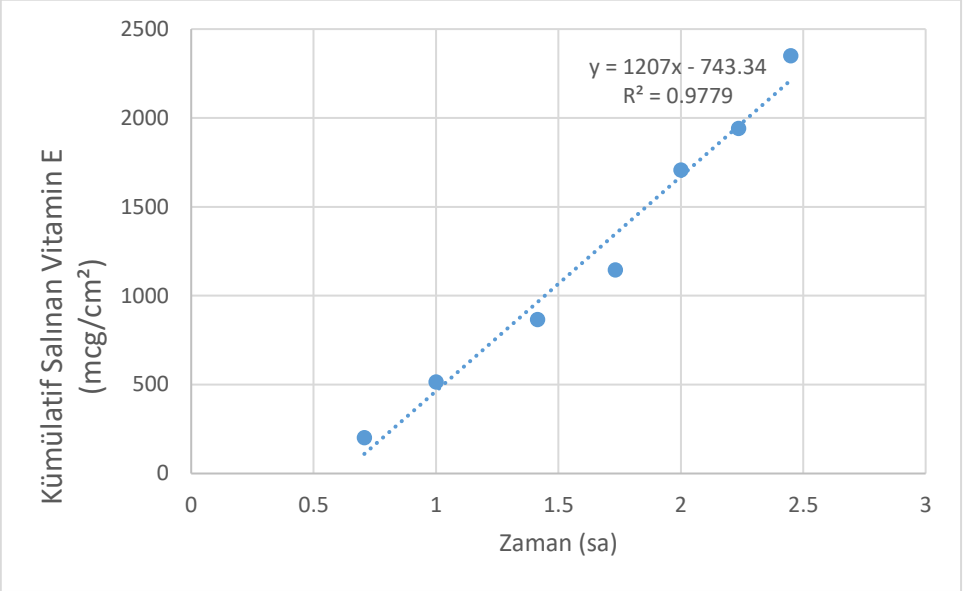
Şekil 4-65: VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-54: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	204,195	192,327	208,983	201,835	8,575126	4,248582
1	484,381	468,184	591,428	514,6643	66,97075	13,01251
2	838,195	842,585	915,284	865,3547	43,29575	5,003237
3	1122,487	1124,375	1188,379	1145,08	37,50963	3,27572
4	1683,973	1636,387	1798,264	1706,208	83,19758	4,876169
5	1985,864	1932,235	1905,486	1941,195	40,93125	2,108559
6	2374,476	2386,642	2287,352	2349,49	54,1558	2,305003



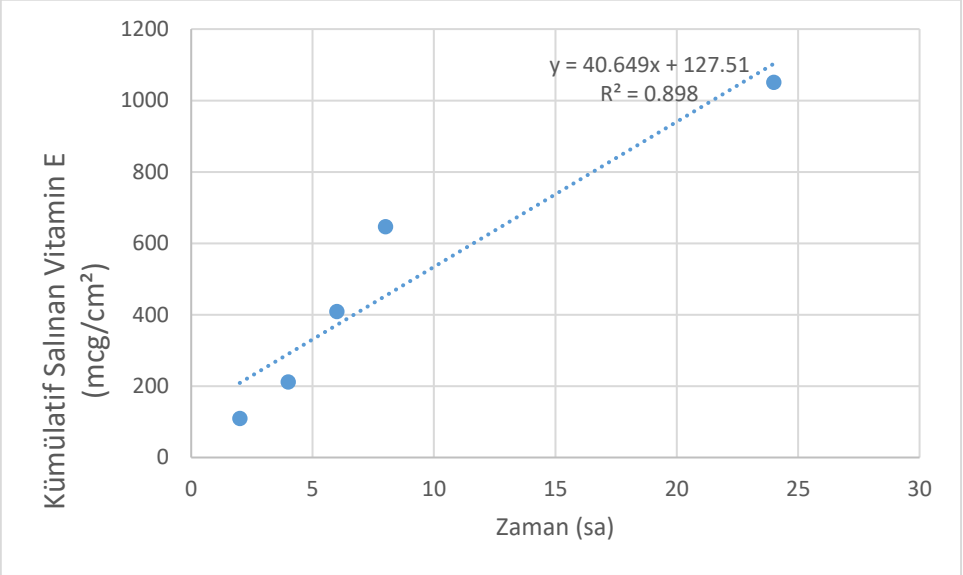
Şekil 4-66: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



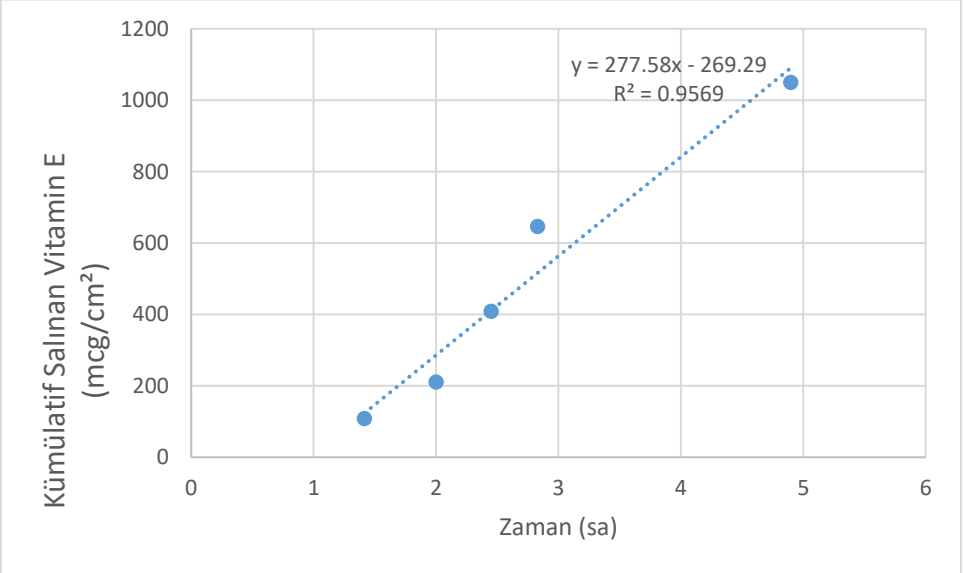
Şekil 4-67: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-55: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	107,258	115,642	104,297	109,0657	5,884556	5,395425
4	216,398	224,218	192,828	211,148	16,34028	7,738783
6	394,734	420,852	410,376	408,654	13,14387	3,216382
8	624,038	679,375	636,563	646,6587	29,01703	4,487224
24	1004,473	1051,658	1095,672	1050,601	45,60869	4,3412



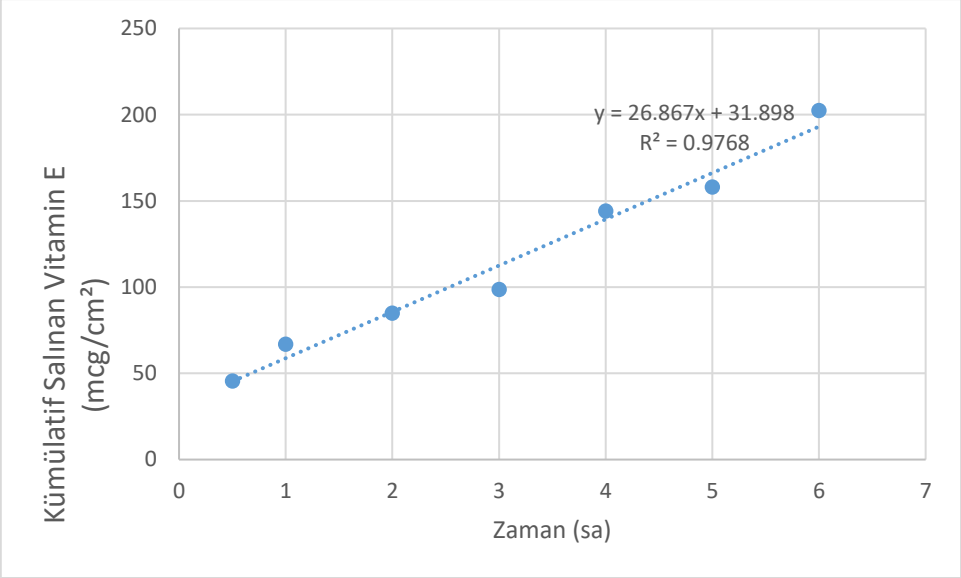
Şekil 4-68: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



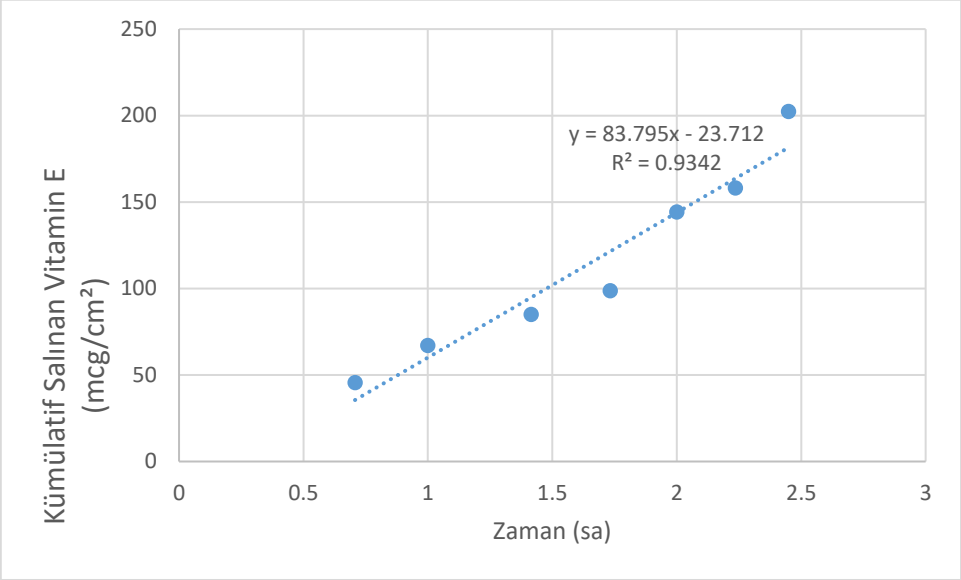
Şekil 4-69: RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-56: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
0,5	48,369	41,074	47,372	45,605	3,955499	8,673389
1	69,463	62,752	68,726	66,98033	3,680339	5,494656
2	88,194	76,633	89,947	84,92467	7,23409	8,518243
3	98,745	92,874	104,723	98,78067	5,924581	5,997713
4	142,272	139,416	150,751	144,1463	5,895371	4,089852
5	159,875	152,589	161,742	158,0687	4,836474	3,05973



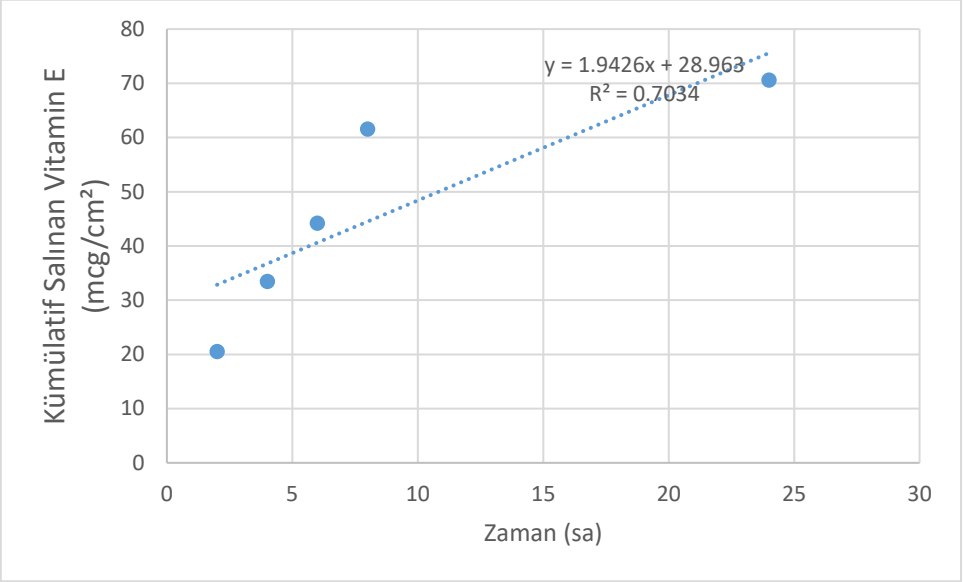
Şekil 4-70: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



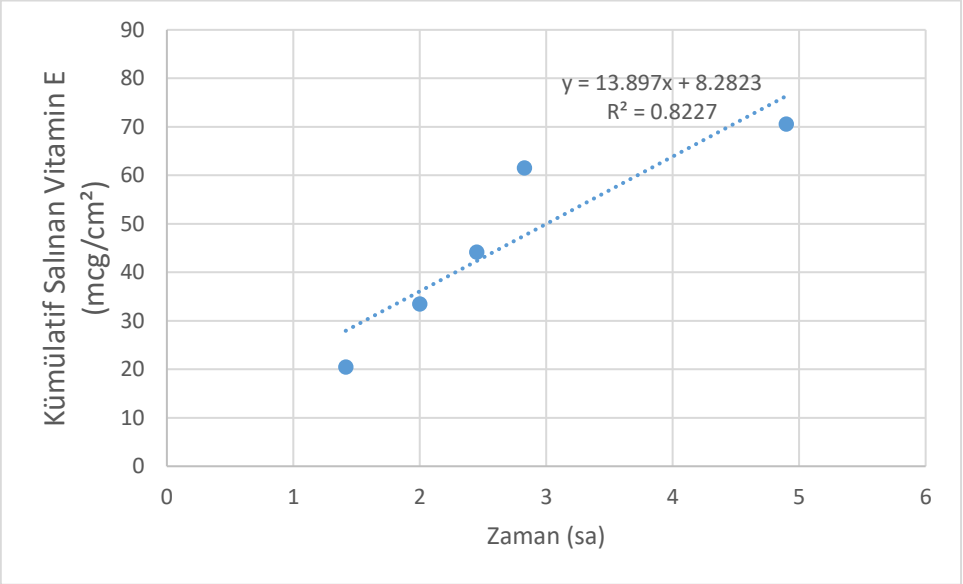
Şekil 4-71: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin yapay membrandan Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-57: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden kümülatif permeasyon miktarları (mcg/cm²)

Zaman (sa)	n=1	n=2	n=3	Ortalama (mcg/cm²)	SD (±)	RSD (%)
2	20,748	21,945	18,831	20,508	1,570812	7,659506
4	33,854	35,927	30,623	33,468	2,672985	7,98669
6	42,751	48,934	40,836	44,17367	4,232303	9,581054
8	64,923	67,452	52,285	61,55333	8,125605	13,20092
24	71,385	77,769	62,603	70,58567	7,614531	10,78765



Şekil 4-72: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)



Şekil 4-73: Krem formülasyonundan Vitamin E'nin domuz derisinden Fick'in Birinci Yasası'na göre in vitro salım profili (n=3)

Tablo 4-58: Vitamin E'nin selüloz asetat membrandan in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi

		VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Krem
Fick'in Birinci Yasası	r^2	0,9669	0,9928	0,9768
	k (mcg/cm^2/sa)	348,85	381,32	26,867
Higuchi Kinetik Modeli	r^2	0,9096	0,9779	0,8331
	k (mcg/cm^2/sa)	1079,1	1207	77,086

Tablo 4-59: Vitamin E'nin domuz derisinden in vitro permeasyon verilerinin kinetik değerlendirilmesi

		VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Lipo	RSV-CoQ10-VitE-Krem
Fick'in Birinci Yasası	r^2	0,8283	0,898	0,7034
	k (mcg/cm^2/sa)	39,216	40,649	1,9426
Higuchi Kinetik Modeli	r^2	0,9063	0,9569	0,8046
	k (mcg/cm^2/sa)	271,36	277,58	11,238

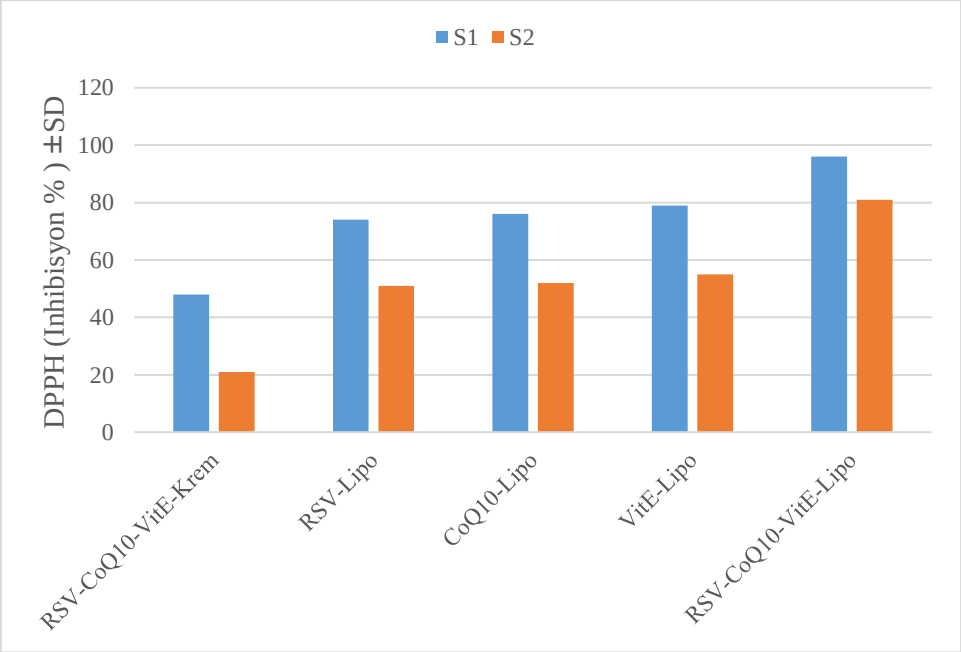
4.5.9. Antioksidan Aktivite Testine Ait Bulgular

İn vitro salım çalışmaları sonucunda tayin edilen etken madde miktarları belirlenmiş ve antioksidan etki tayin edilmiştir.

Tablo 4-60: Salım çalışmalarından elde edilen örneklerin antioksidan aktivitelerine ait sonuçlar (n=3)

Formülasyonlar	Salım Örnekleri	DPPH (%İnhibisyon)±SS
RSV-KoQ10-VitE-Krem	S1	%48,24 ± 2,1
	S2	%21,48 ± 1,7
RSV-Lipozom	S1	%74,21 ± 1,6
	S2	%51,28 ± 2,4
KoQ10-Lipozom	S1	%76,5 ± 1,3
	S2	%52,45 ±0,9
VitE-Lipozom	S1	%79,02 ± 1,3
	S2	%55,30 ± 1,2
RSV-KoQ10-VitE-Lipozom	S1	%96,42 ± 0,9
	S2	%81,36 ± 1,1

*Veriler ortalama değer±standart sapma kullanılarak ifade edilmiştir (SS:standart sapma, mmol/L: milimol/litre, (S1: Selüloz asetat membrandan salım örneği, S2: Domuz derisinden salım örneği)



Şekil 4-74: Salım çalışmalarından elde edilen örneklerin antioksidan aktiviteleri

Hem selüloz asetat membrandan hem de domuz derisinden salım örnekleri 24 saatin sonunda DPPH• radikalinin %50'den fazlasını süpürebilmiştir.

Optimum formülasyon olarak seçilen RSV-KoQ10-VitE-Lipozom formülasyonun antioksidan aktivitesi %90'ın üzerinde bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Cilt yaşlanması iç ve dış faktörlerin neden olduğu bir biyolojik süreçtir (1). İçsel yaşlanma, genetik ve doğal olarak gerçekleşmektedir. Dış kökenli yaşlanma ise hava kirliliği, sigara, kötü beslenme ve güneşe maruz kalma gibi dış çevre faktörlerinden kaynaklanır (95). Özellikle, ultraviyole ışınlarına uzun süreli maruz kalma, dış cilt yaşlanmasının birincil faktörüdür ve fotoyaşlanma olarak adlandırılır. Bu yaşlanma süreçlerine kutanöz hücrelerde fenotipik değişikliklerin yanı sıra cilde gerilme kuvveti, elastikiyet ve hidrasyon sağlamak için gerekli olan kollajenler, elastin ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matris bileşenlerinde yapısal ve fonksiyonel değişiklikler eşlik eder (95, 96). Cilt elastikiyeti kaybı zamanla ciltte sarkmaya yol açar (96). Ultraviyole ışınları, deride serbest radikal üretimini arttırıp vücudun doğal antioksidan savunma mekanizmasını zayıflatır. Oksidatif stres epidermiste DNA hasarına ve dermal matrikste düzensizliğe neden olur (2). Antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri nötralize edip dokulardaki oksidatif stresi önleyerek cildi fotoyaşlanmaya karşı koruyan maddelerdir (3). Antioksidanlar, reaktif molekülleri inhibe ederek zararlı serbest radikalleri nötralize eder, böylece hücreleri endojen ve eksojen stres faktörlerinden korur, hücrelerin yaşamlarını ve canlılıklarını uzatır (144). Cildi iyileştirmek için topikal veya sistemik antioksidanlar tarafından ROS etkilerinin azaltılması, kırışıklık oluşumunu engellemeye veya geciktirmeye yönelik bütünsel bir yaklaşımdır (143). Yapılan çalışmalarda, cildi ek antioksidanlarla takviye etmenin güneş kaynaklı hasarlara karşı dikkat çekici bir şekilde ek koruma sağladığı, cilt yaşlanmasını yavaşlattığı, iltihabı azalttığı ve nihayetinde cilt görünümünü iyileştirdiği gösterilmiştir (145).

Resveratrol, polifenolik bir antioksidandır. UV kaynaklı lipid peroksidasyonunun güçlü bir inhibitörüdür (5). Yapılan çalışmalarda resveratrolün antioksidan özelliğinin, E vitaminden 50 kat ve C vitaminden 30 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (3). İnsan keratinosit hücreleriyle yapılan çalışmalar, transresveratrolün hidrojen peroksit üretimini inhibe ederek UVA radyasyonunun neden olduğu fotoyaşlanmaya karşı cildi koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (153). Resveratrol antiinflamatuar etkisi ile doku hasarını ve hücresel proliferasyonu engellemektedir (154). In vitro çalışmalar, resveratrolün hem AP-1 hem de NFkB'nin aşağı doğru regülasyonunda rol alıp böylece dermal kollajenin

korunmasında ve cilt iltihabının azaltılmasında önemli bir rol oynadığını göstermiştir (155). Resveratrol bir fitoöstrojen ve östrojen beta reseptör agonisti (ERβ)'dir (159). Menopoz sonrası kadınların yılda %1 oranında kolajen kaybettiği ve cildin ince, kırışık ve kırılgan hale geldiği bilinmektedir (160). Östrojen replasman tedavisi kolajen kaybını azaltır ve cilt yaşlanmasının klinik belirtilerini iyileştirir. Yapılan çalışmalarda, resveratrol gibi fitoöstrojenlerin kullanımının, cilt yaşlanmasını önlemede faydalı olduğu bulunmuştur (161, 162). Resveratrolün emilim oranı yüksek olmasına rağmen biyoyararlanımı çok düşüktür (163). Yapılan bir çalışmada, 25 mg resveratrolün oral dozu %70 absorpsiyon ile sonuçlanmasına karşın, resveratrol ve metabolitlerinin (glukuronid ve sülfat konjugatı) plazma konsantrasyonu sadece 2 μM olarak bulunmuştur (164). Resveratrolün düşük oral biyoyararlanıma sahip olması, topikal olarak kullanımının daha yararlı olacağını düşündürmektedir.

Koenzim Q10 (CoQ10), endojen bir antioksidandır. Hücre büyümesini uyarır ve serbest radikalleri temizler (5). Epidermiste doğal olarak bulunan koenzim Q10 seviyesi, UV maruziyeti sonucu azalır. Cilt yaşlanmasını engellemek amacıyla azalan koenzim Q10'un yerine konması için vücuda dışarıdan koenzim Q10 takviyesi yapılmasının faydalı bir yaklaşım olduğu düşünülebilir. Yapılan çalışmalarda, koenzim Q10'un topikal uygulamasının UV ışınlarına maruz kalmış ciltteki kırışıklıkları azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir (180, 183). Hoppe ve arkadaşları, 6 ay boyunca insan derisine topikal olarak uygulanan CoQ10'un kırışıklıkların derinliğini azalttığını kanıtlamıştır. Koenzim Q10'un topikal olarak uygulanması aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonları geliştirerek hücresel düzeyde yaşlanmayı geciktirmiştir (185). Muta-Takada ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Koenzim Q10'un bazal membran bileşenlerinin üretimini arttırdığı, fibroblast proliferasyonunu arttırdığı ve hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu gösterilmiş ve böylece koenzim Q10'un cilt üzerindeki yaşlanma karşıtı etkileri kanıtlanmıştır (186). Koenzim Q10, büyük moleküler ağırlığa ve suda düşük çözünürlüğe sahiptir. Ayrıca, koenzim Q10 ışığa maruz kaldığında bozunmaya uğrar (184). Bu sınırlamaların önüne geçebilmek için koenzim Q10'un deriye penetrasyonunu ve stabilitesini arttırmaya yönelik bir taşışıyıcı sistem seçilmesi faydalı olacaktır.

E Vitamini, insan vücudunda bulunan başlıca yağda çözünen antioksidandır (165). E vitamini, antioksidan özellikleri ve serbest radikalleri temizleme ve lipit yapılarının bir parçası olma yeteneği sayesinde, lipit peroksidasyonuna karşı koruma sağlar ve cilt yaşlanmasını yavaşlatır. Stratum korneumun lipit yapısının oluşumunda ve proteinlerin oksidasyondan korunmasında önemli rol oynar (168). Yapılan bir çalışmada, oksidatif strese maruziyetten 30 dakika önce cilde tokoferol uygulanmasının, H_2O_2 indüksiyonunu, miyeloperoksidaz aktivitesini, ksantin oksidaz aktivitesini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (171). E vitamini yağda çözünen (lipofilik) bir vitamindir ancak membrana nüfuz etmesi zordur. Kolayca oksitlenir, dolayısıyla raf ömrü nispeten kısadır (216).

Etken maddeler topikal olarak uygulandıklarında formülasyondan serbestleştikten sonra difüzyon ile deriye penetre olurlar. Topikal olarak uygulanan antioksidanlar, oluşan serbest radikalleri nötralize ederek ve dokulardaki oksidatif stresi önleyerek cildi fotoyaşlanmaya karşı korumaktadır. Ancak stratum cornum tabakasının bariyer özelliği, etkenlerin deriye penetrasyonu sınırlamaktadır (163).

Lipozomlar, bir veya daha fazla fosfolipit çift tabakadan oluşan veziküler taşıyıcı sistemlerdir (8). Membranlarının stratum korneum lipidlerine benzemesi ve küçük moleküler yapıları sayesinde deriye kolayca geçebilirler. Hem lipofilik hem hidrofilik etken maddeleri taşıyabilirler. Çabuk bozunan, düşük oral biyoyararlanıma sahip etken maddelerin lipozomlarının hazırlanması ile stabilitelerinin arttırılması, daha derin katmanlara kısa sürede ve eşit dağılımlı olarak taşınabilmeleri sağlanabilmektedir (9). Önceki çalışmalar, antioksidanların lipozomlarla kapsüllenmesinin bu maddelerin biyoyararlanımlarını ve stabilitelerini artırabildiğini göstermiştir (63, 64, 65). Arora ve ark. yaşlanma karşıtı resveratrol yüklü bir veziküler jel geliştirmiş ve resveratrolün veziküler jel içinde kapsüllenmesinin, konvansiyonel resveratrol jelden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (264). Caddeo ve ark. resveratrol yüklü lipozomların endojen ve kimyasal olarak indüklenen reaktif oksijen türlerini azaltabildiğini ve fibroblastları serbest radikallerin etkilerinden serbest resveratrolden daha etkili bir şekilde koruyabildiğini göstermiştir (267). Lee ve ark. CoQ10'un lipozomlara kapsüllenmesinin sıçan derisinden nüfuzunu arttırdığını göstermiştir (262). Gökçe ve ark. CoQ10 yüklü lipozomları ve katı lipit

nanoparçacıkları CoQ10'un geçişi için karşılaştırmış ve CoQ10'un lipozomal formülasyonunun cilt hücrelerini serbest radikallere karşı koruduğunu, CoQ10'un katı lipit nanopartiküllerinin ise ROS birikimine karşı cilt hücrelerini korumada etkili olmadığını bildirmişlerdir (269). Çalışmalar, antioksidan lipozomların, serbest, kapsüllenmemiş antioksidanlarla karşılaştırıldığında oksidatif strese bağlı doku hasarına karşı çok daha iyi koruma sağladığını açıkça göstermektedir.

Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E, cildin yaşlanmasına neden olan serbest radikalleri nötralize ederek yaşlanma karşıtı etkiler için kullanılabilen antioksidan bileşiklerdir (163). Piyasada lipozomal antioksidan formülasyon örnekleri olmasına rağmen resveratrol, koenzim Q10 ve E vitaminini kombinasyon halinde içeren topikal bir lipozomal formülasyon şu ana kadar geliştirilmemiştir (270-272). Antioksidanların aynı formülasyonda birlikte kullanıldıklarında birbirlerinin antioksidan aktivitesini arttırdıkları çalışmalarla kanıtlanmıştır (20, 38, 39, 273, 274). Serbest radikallere karşı korumada resveratrol ve antioksidan vitaminlerin birlikte, tek başına olduğundan daha iyi çalıştığı rapor edilmiştir (61). Ayrıca CoQ10 ve VitE bir araya geldiklerinde birbirlerinin antioksidan aktivitesini arttırmaktadır. CoQ10 ve VitE, ROS'un prooksidan etkilerini ortadan kaldırmak için birlikte çalışır. Membran lipit çift katmanında CoQ10, tokoferoksil radikalinden a-tokoferolü (VitE) geri dönüştürebilir, VitE kaybını ve lipit peroksidasyonunu önleyebilir (62). Bu durum, RSV, CoQ10 ve VitE'nin birlikte bir lipozomal formülasyon halinde kapsüllenmesi, ROS ve fotoyaşlanmaya karşı yüksek antioksidan koruma elde etmek için etkili olacağını düşündürmektedir.

Kozmetik bileşenlerinin ilk değerlendirmesi için in vitro test yapılmaktadır. Kozmetik preparatlar franz difüzyon hücreleri ile geçirgenlik ve stabilite açısından değerlendirilir (12). 2013 yılında kozmetiklerin hayvanlar üzerinde denenmesine ilişkin AB yasağının ardından, doğru in vitro verilerin önemi artmıştır (245). Franz difüzyon hücresi, insan derisine uygulanan topikal preparatlardan epidermise veya dermise nüfuz eden ve sistemik dolaşıma geçen bileşen miktarını ölçen veya tahmin eden difüzyon testleri için kurulmuş bir sistemdir. Franz hücresi penetrasyon ya da difüzyon çalışmaları, topikal ürünlerin etkinliğini araştırmak için önemli bir araştırma yöntemi haline gelmiştir. Elde edilen sonuçların in vivo korelasyonlarının yüksek olması in vivo deneylere olan ihtiyacı azalttığı için Franz

difüzyon sistemleri çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (246). Franz hücresi difüzyon testlerinde biyolojik (insan, fare, domuz) veya sentetik (polimerik, selüloz bazlı) membranlar kullanılmaktadır (245). Domuz gibi hayvanlardan (kobay, sıçan, fare gibi kemirgenler, primatlar, tavşan) izole edilmiş deri kolayca elde edilebilmeleri, canlılık ve enzimatik aktivite ile deri permeasyon çalışmalarından önce taze olarak eksize edilebilmeleri ve daha az değişkenlik göstermeleri nedeniyle rutin olarak insan derisine alternatif olarak kullanılmaktadır. Bu tür modellerde domuz derisi, insan derisine pek çok benzerliği (yağ birikintileri, foliküller, yoğunluk) olduğu ve kolay erişilebilir olduğu için yaygın olarak tercih edilir. Domuz derisi tüy yoğunluğu (~20 tüy/cm2), Langerhans hücreleri gibi yapıların varlığı, stratum corneum kalınlığı, glikosfingolipidler ve seramidler gibi içerikler, tabakalı, çok tabakalı, keratinize edici epitel, canlı epidermisin kalınlığı (~70 um), dermiste kollajen lif düzenlemesi bakımından insan derisi ile benzerlik göstermektedir. Domuz derisi, homojen numunelerin alınması için tercih edilen çoklu numune ekstraksiyonu için yeterince geniş bir deri yüzeyine sahiptir ve hayvanın boyutu açısından pratiktir. Bu nedenle, domuz derisi (dermatom veya tam kalınlık), transdermal ilaç taşıyıcı sistemlerin deri geçirgenliğini değerlendirmede sıklıkla olarak kullanılmaktadır (249).

Tüm bu bilgilerden hareketle bu doktora tez çalışmasında, resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E'den oluşan bir lipozomal formülasyon, aynı aktif maddeleri tek tek içeren lipozomlar ve aynı antioksidan kombinasyonunu içeren konvansiyonel bir krem geliştirilmesi; hazırlanan formülasyonların karakterizasyonu yapılarak bu formülasyonların in vitro olarak sentetik (selüloz asetat) mebrandan ve domuz derisinden geçiçlerinin incelenerek geçiş miktarlarının ve antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında öncelikle in vitro geçiş çalışmalarında örneklerdeki resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E'nin miktar tayini analizlerinde kullanılacak olan literatürde kayıtlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) metotları kullanıldı ve bu metotlara ait validasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Validasyon çalışması kapsamında kullanılması planlanan metotlar doğrusallık, doğruluk ve geri kazanım, kesinlik, özgünlük ve seçicilik, duyarlılık ve saptama sınırı değerlendirildi.

Resveratrol miktar tayini için kullanılacak HPLC yönteminin validasyonu için doğrusallık çalışması sonucunda kalibrasyon eğrisinin (Şekil 4-2) determinasyon katsayısı $R^2 = 0,9992$ olarak bulundu. Bu değerin kabul kriterinden (0,998) yüksek bir değer olması ve varyasyon katsayısının %2'den küçük olması miktar tayini için doğru denkleminin kullanılabileceğini gösterdi. Doğruluk için %5, %100 ve %150 konsantrasyonda numuneler ile çalışıldı (Tablo 4-1). Geri kazanım değerleri hesaplandı. 0,00100 ml/ml çözeltisi için 95,794 - 96,276 olarak, 0,02000 mg/ml çözeltisi için 97,594 - 97,704 aralığında, 0,03000 mg/ml çözeltisi için 97,386- 97,674 aralığında bulundu. Hesaplanan ortalama geri kazanım miktarları, kabul edilebilir olarak kabul edilen %90-110 aralığındadır. Tekrarlanabilirlik (Tablo 4-2) ve ara kesinlik (Tablo 4-3) çalışmalarındaki varyasyon katsayıları <%2 olarak bulunduğundan kullanılan yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varıldı. Seçicilik çalışmasında resveratrolün pik verdiği dalga boyunda ve resveratrol ile aynı zamanda mobil faz, boş lipozom, koenzim Q10 ve vitamin E'nin pik vermediği görüldü (Şekil 4-4). Yöntemin resveratrol tayinine uygun olduğuna karar verildi. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.014 µg/mL, saptama sınırı 0.045 µg/mL olarak bulundu. Sonuç olarak, resveratrolün yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini yönteminin belirli koşullar altında sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiği görüldü.

Koenzim Q10 miktar tayini için kullanılacak HPLC yönteminin validasyonu için doğrusallık çalışması sonucunda kalibrasyon eğrisinin (Şekil 4-5) determinasyon katsayısı $R^2 = 1,0000$ olarak bulundu. Bu değerin kabul kriterinden (0,998) yüksek bir değer olması ve varyasyon katsayısının %2'den küçük olması miktar tayini için doğru denkleminin kullanılabileceğini gösterdi. Doğruluk çalışması için %5, %100 ve %150 konsantrasyonda numuneler ile çalışıldı (Tablo 4-4). Geri kazanım değerleri hesaplandı. 0,00100 ml/ml çözeltisi için 97,000- 98,000 olarak, 0,02000 mg/ml çözeltisi için 98,250- 98,600 aralığında, 0,03000 mg/ml çözeltisi için 98,333- 98,733 aralığında bulundu. Hesaplanan ortalama geri kazanım miktarları, kabul edilebilir olarak kabul edilen %90-110 aralığındadır. Tekrarlanabilirlik (Tablo 4-5) ve ara kesinlik (Tablo 4-6) çalışmalarındaki varyasyon katsayıları <%2 olarak bulunduğundan kullanılan yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varıldı. Seçicilik çalışmasında koenzim Q10'un pik verdiği dalga boyunda mobil faz, boş lipozom, reveratrol ve vitamin E'nin pik

vermediği görüldü (Şekil 4-8). Yöntemin koenzim Q10 tayinine uygun olduğuna karar verildi. Analitik yöntemin duyarlılığı 0.166 µg/mL, saptama sınırı 0.5 µg/mL olarak bulundu. Sonuç olarak, koenzim Q10'un yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini yönteminin belirli koşullar altında sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiği görüldü.

Vitamin E miktar tayini için kullanılacak HPLC yönteminin validasyonu için doğrusallık çalışması sonucunda kalibrasyon eğrisinin (Şekil 4-9) determinasyon katsayısı $R^2 = 0,9992$ olarak bulundu. Bu değerin kabul kriterinden (0,998) yüksek bir değer olması ve varyasyon katsayısının %2'den küçük olması miktar tayini için doğru denkleminin kullanılabileceğini gösterdi. Doğruluk çalışması için %5, %100 ve %150 konsantrasyonda numuneler ile çalışıldı (Tablo 4-7). Geri kazanım değerleri hesaplandı. 0,00100 ml/ml çözeltisi için 95,000-98,000 olarak, 0,02000 mg/ml çözeltisi için 98,600- 98,900 aralığında, 0,03000 mg/ml çözeltisi için 98,933- 99,033 aralığında bulundu. Hesaplanan ortalama geri kazanım miktarları, kabul edilebilir olarak kabul edilen %90-110 aralığındadır. Tekrarlanabilirlik (Tablo 4-8) ve ara kesinlik (Tablo 4-9) çalışmalarındaki varyasyon katsayıları <%2 olarak bulunduğundan kullanılan yöntemin tekrarlanabilir olduğu sonucuna varıldı. Seçicilik çalışmasında vitamin E'nin pik verdiği dalga boyunda mobil faz, boş lipozom, resveratrol ve koenzim Q10'nun pik vermediği görüldü (Şekil 4-12). Yöntemin vitamin E tayinine uygun olduğuna karar verildi. Analitik yöntemin duyarlılığı 0,185 µg/mL, saptama sınırı 0,561 µg/mL olarak bulundu. Sonuç olarak, vitamin E'nin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile miktar tayini yönteminin belirli koşullar altında sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiği görüldü.

Lipozomlar, farklı polarite ve büyüklükteki materyalleri kapsülleme kapasitesine sahiptir. Kapsülleme kapasitesi, yapılarında fosfolipid çift katmanlarının varlığı ile arttırılır (208). Bunun yanında konvansiyonel lipozomların kullanımının çeşitli sınırlamaları bulunmaktadır. Bu sınırlamalar, konvansiyonel lipozomların, terapötik maddelerin yavaş salınımına ve gelişmiş biyoyararlanımına izin vermek için dolaşımda daha uzun süre kalamamasıdır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek adına yapılan çalışmalarda, çift tabaka yapısında

soya fasulyesi ve yumurta sarısı gibi doğal kaynaklardan elde edilen fosfolipitlerin seçiminin lipozom özelliklerini etkilediği sonucuna varılmıştır (202, 209).

Lesitin soya, yumurta sarısı, deniz kaynakları ve süt gibi kaynaklardan elde edilebilmektedir. Ancak lipozomal formülasyon için, soya fasulyesi dışındaki kaynaklardan elde edilen lesitin bazı dezavantajlar taşır. Sığır veya yumurtadan elde edilen lipitler, yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle stabilite sorunlarına sahiptir. Ayrıca, hayvansal kaynaklardan elde edilen lesitin, protein kontaminasyonu ve/veya virüsler gibi patojenik kontaminasyon olasılığını beraberinde getirir (211, 212). Soya fasulyesinden elde edilen lesitin, üretim açısından daha ekonomik, daha güvenli ve stabil (daha az çoklu doymamış yağ asitleri) olarak kabul edilmektedir (213). Soya lesitini, iki açil zinciri doymamış olan doğal malzemelerden elde edilen bir fosfolipittir. Doymamış asil zincirlerine sahip doğal kaynaklı fosfolipitler daha geçirgendir ve bu da aktif maddenin adsorbe edilmesini kolaylaştırır (211, 214). Lipozomlarda fosfolipitler vezikülleri oluşturan ana elementlerdir. Daha yüksek fosfolipid konsantrasyonu kullanımı, daha fazla vezikül oluşmasına neden olur, böylece ilacın hapsolmasının da daha uygun olması beklenir. Daha fazla vezikül oluşur, böylece daha fazla etken madde tutulur. Ancak lesitin konsantrasyonu çok yüksekse, kapsülleme verimliliği azalabilir. Bunun için optimal lesitin – kolesterol konsantrasyonunu belirlemek önemlidir (216). Bu bilgiler ışığında, önformulasyon çalışmasında, farklı konsantrasyonlarda soya lesitini: kolesterol içeren boş lipozomlar ince film hidratasyon yöntemiyle hazırlandı, % 2 soya lesitini ve %2 kolesterol içeren lipozomun partikül boyutu 76,616 nm ± 0,03, polidispersite indeksi 0,231 ± 0,01 ve zeta potansiyeli - 50,189 mV ± 0,8 olarak bulundu ve aktiflerin yüklenmesi için uygun boş lipozom olarak seçildi.

Lipozomların karakterizasyonu, lipozomların kalitesinin anlaşılmasında önemli bir role sahiptir. Parçacık boyutu ve polidispersite indeksi, etkinlik, stabilite ve güvenlik üzerindeki etkilerinden dolayı veziküllerin karakterizasyonu için önemli parametrelerdir. Büyük parçacıkların daha derin cilt katmanlarına nüfuz edememeleri nedeniyle hedef doku içerisinde istenilen yere ulaşmada zorluk yaşadıkları bilinmektedir (66). Lipozom karakterizasyonu çalışmasında, etken madde içermeyen lipozomların partikül büyüklükleri 76,2 ± 0,01 nm, RSV-Lipo

formülasyonunun partikül büyüklüğü 89,02 ± 0,04 nm, CoQ10-Lipo formülasyonunun partikül büyüklüğü 87,55 ± 0,02 nm, VitE-Lipo formülasyonunun partikül büyüklüğü 90,45 ± 0,03 nm, RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonunun partikül büyüklüğü ise 95.4 ± 0.02 nm olarak ölçüldü. RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonunun parçacık boyutu tüm lipozomal formülasyonlar arasında en yüksek bulunmuştur. Daha büyük parçacık boyutuna sahip lipozomal formülasyonların stratum korneumda kalması ve yüzeyde bir lipit tabakası oluşturarak kurumaya eğilimli olması nedeniyle derinin daha derin katmanlarına penetrasyon için lipozomların parçacık boyutunun 300 nm'den küçük olması gerektiği daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir. 300 nm'den küçük veziküller, aktif maddeleri cildin daha derin katmanlarına iletebilir ve deriye geçiş için avantajlıdır (67, 68). Nava ve ark., daha küçük parçacık boyutuna sahip veziküler taşıyıcı sistemlerin, daha büyük parçacık boyutuna sahip veziküllere göre deriden daha verimli bir şekilde nüfuz ettiğini göstermiştir (67, 69). Tez çalışmasında elde edilen partikül boyutu verileri, lipozomal formülasyonların 300 nm'den daha küçük bir parçacık boyutuna sahip olduğunu göstermektedir; bu da hazırlanan lipozomların aktif maddeleri derinin daha derin katmanlarına iletme potansiyelini doğrulamaktadır. Yapılan bir çalışmada, Chen ve ark. ortalama çapı 166 nm olan CoQ10 yüklü lipozomlar geliştirmiştir (70). Layas ve ark. resveratrol yüklü lipozomların 197,4 ± 102,4 ile 457,9 ± 56,1 nm arasında bir boyut aralığı ortaya çıkardığını bildirmiştir (71). Vijayakumar ve ark. vezikül büyüklüğü 125.5 ± 9.25 nm ila 134.2 ± 9.13 arasında değişen resveratrol ve E vitamini içeren lipozomlar geliştirmiş ve sonikasyon süresinin arttırılmasının, trans-resveratrol ve D-α-tokoferol içeren lipozomların hazırlanması sırasında vezikül boyutunda değişikliklere yol açtığını göstermiştir (72). Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasındaki lipozomların parçacık boyutunun 100 nm'nin altında olmasının, sonikasyon süresinin daha uzun olmasından kaynaklandığı söylenebilir.

Zeta potansiyeli, lipozomların stabilitesinin değerlendirilmesi için önemli bir parametredir. Vanaja ve ark. zeta potansiyel değeri +30 mV'den büyük ve -30 mV'den küçük olan kolloidal sistemlerin stabil olduğunu bildirmiştir (73). Tez çalışmasında, hazırlanan tüm lipozomal formülasyonların negatif yüzey yükü vardı; bu, lipozomal dispersiyonların homojen bir dağılıma sahip olduğunu ve daha stabil olduğunu gösterdi. Zeta potansiyellerinin negatifliği, fosfolipitlerin

fonksiyonel grupları negatif yüklü olduğundan fosfolipidlerin varlığından kaynaklanmaktadır. Literatüre göre, 30 mV'den fazla zeta potansiyeline sahip lipozomal dispersiyonlar stabil olarak kabul edilmekte ve 30 mV'den az olan lipozomlar, düşük elektrostatik itme ve van der Walls etkileşimlerinin üstesinden gelinmesi nedeniyle topaklanma eğilimi göstermektedir. Zeta potansiyeli 30 mV'un altındaysa çekici kuvvetler, itici elektrostatik kuvvetleri yenerek topaklaşmaya neden olmaktadır (73). Vijayakumar ve ark. zeta potansiyelleri -37,26 ± 1,16 mV ile -64,35 ± 0,16 mV arasında ve polidispersite indeksi 0,182 ± 0,03 ile 0,265 ± 0,01 arasında olan resveratrol ve E vitamini içeren lipozomlar geliştirmiştir (71). Gökçe ve ark. CoQ10 yüklü lipozomların zeta potansiyelinin -36,6 ± 0,9 mV ve PDI 0,458 ± 0,03 olduğunu göstermiştir (55). Tez çalışmasının zeta potansiyeli ölçümleri ile ilgili olarak, tüm lipozomal formülasyonların zeta potansiyelleri kabul edilebilir aralık dahilinde bulundu (Tablo 4-22, Tablo 4-23, Tablo 4-24, Tablo 4-25, Tablo 4-26); bu, araştırılan formülasyonların karakterizasyon sonuçlarının daha önce yayınlanmış verilerle uyumlu olduğunu gösterdi. Yeni geliştirilen lipozomal formülasyonların partikül boyutu dağılımı 0,3'ün altındaydı, bu da lipozomların homojenliğini gösterdi.

Formülasyonların çeşitli saklama koşullarında (4◦C, 25◦C, 40◦C ± %60 bağıl nem) stabilitelerini analiz etmek amacıyla vezikül boyutu, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, pH ve kapsüllenen aktif madde miktarları farklı zamanlarda (0, 7, 30, 60, 90 ve 180. günde) ölçüldü ve karşılaştırıldı. RSV-Lipo, CoQ10-Lipo, VitE-Lipo ve RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonlarının 180 gün boyunca 4◦C, 25◦C, 40◦C sıcaklık ve %60 ± 5 nem ortamında saklanmasından sonra yapılan değerlendirmede tüm lipozomların damlacık büyüklüğünün arttığı ancak kabul edilebilir aralıkta olduğu saptandı. Polidispersite indeksi tüm lipozomlarda artarken (Tablo 4-13, Tablo 4-15, Tablo 4-17, Tablo 4-19, Tablo 4-21), kabul edilebilir aralıkta olduğu gözlendi. Lipozomal formülasyonların zeta potansiyeli ve pH değerlerinde anlamlı bir değişim olmadığı saptandı, bu da lipozomların stabil olduğunu gösterdi.

Kapsülleme verimlilikleri göz önüne alındığında, RSV-Lipo formülasyonunda hazırlandıktan sonra (sıfırıncı gün) kapsüllenen resveratrol miktarı % 95,27 ±0,98, CoQ10-Lipo'da kapsüllenen koenzim Q10 miktarı %96,75

±1,06, VitE-Lipo'da kapsüllenen vitamin E miktarı %96,86 ±0,92 olarak bulundu. RSV-CoQ10-VitE-Lipo'daki etken madde miktarları ise resveratrol için %94,97 ±0,85, koenzim Q10 için %95,88 ±0,75, vitamin E için %95,63 ±0,55 olarak bulundu. 180 günlük saklamadan sonra lipozomların aktif madde içeriğinde hafif bir azalma vardır, ancak tüm değerler %60'ın üzerindedir, bu da tüm lipozomal formülasyonların yüksek stabiliteye sahip olduğunu gösterir. Vanaja ve ark. kapsülleme etkinlikleri sırasıyla >%90 ve >79 olan RSV ve VitE lipozomlarını geliştirmişlerdir (73). Bu çalışmada, tüm lipozomal formülasyonların kapsülleme etkinliğinin 90'dan yüksek olması, lipozomların hızla bozunma eğilimi gösteren aktif maddelerin stabilitesini arttırmak için uygun taşıyıcı sistemler olabileceğini kanıtlamaktadır. Urano ve ark., α-tokoferolün lipozomların membran özelliklerini sulu çözünen maddelere karşı daha az geçirgen hale getirerek ve protein kaynaklı bozulmaya karşı dirençli hale getirerek stabilitelerini arttırdığını ortaya koymuştur (74). Eriksson yaptığı çalışmada, koenzim Q10'un membranın hidrofilik maddelere ve suya karşı geçirgenliğini azaltarak, lipozomları deformasyona karşı dirençli hale getiren, lipid membranlar üzerinde genel bir stabilize edici etkiye sahip olduğunu göstermiştir (75). Bu tez çalışmasında, 40◦C'de 180. günün sonunda RSV-Lipo'daki bozunmadan kalan resveratrol miktarı %68,03 ±0,93 iken RSV-CoQ10-VitE-Lipo'daki bozunmadan kalan resveratrol miktarı %80,08 ±0,82 olarak bulunmuştur. Bu durum, formülasyonda kullanılan diğer antioksidanların (VitE ve CoQ10) varlığının, formülasyonun stabilitesinin arttırılmasına yardımcı olduğunu göstermektedir.

Aktif maddelerin ve deriye uygulanacak ürünün sitotoksisitesinin belirlenmesi çok önemlidir. Bu amaçla tez çalışmasında, RSV, CoQ10 ve VitE'nin toksik konsantrasyonunu belirlemek için MTT testi yapıldı. RSV, CoQ10 ve VitE ile lipozomların L929 fare fibroblast hücre canlılığı üzerindeki etkileri 24 saat boyunca gözlemlendi (74). Lipozomda kullanılacak lipitlerin hücrelere etkisini görmek için etken madde içermeyen, sadece soya lesitini ve kolesterolden oluşan lipozomlar hazırlandı ve MTT testine tabi tutuldu. MTT sonuçları, aktif bileşenlerin kullanılan %1 konsantrasyonunda %80'den yüksek hücre canlılığı değerleri ile hücresel toksisiteye neden olmadığını gösterdi. Bu nedenle lipozomal formülasyonlarda bu konsantrasyonlar kullanıldı. Ayrıca boş lipozomlar, RSV-Lipo, CoQ10-Lipo, VitE-Lipo ve RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonları MTT

test sonuçlarına göre hücresel toksisiteye neden olmadı. Hücre canlılığının %80'in üzerinde olduğu görüldü. Vanaja ve ark. resveratrol ve E vitamini içeren lipozomlara maruz bırakılan hücrelerin MTT testi ile hücre canlılığının %90'ın üzerinde bulunduğunu bildirmişlerdir (73). Bu bilgiden hareketle, bu tez çalışmasında hazırlanan lipozomların hücre canlılığı sonuçları uygun ve literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Tez çalışmasında dört farklı lipozomal formülasyon ve krem formülasonundan aktif bileşenlerin geçişi selüloz asetat membrandan (0,45 μm) ve domuz derisinden in vitro incelendi. Lipozomlarda tutulan RSV, CoQ10 ve VitE'nin in vitro difüzyon testi Franz difüzyon hücresi kullanılarak yapıldı. Donör faz olarak RSV-Lipo, CoQ10-Lipo, VitE-Lipo, RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonları ve RSV-CoQ10-VitE-Krem kullanıldı. In vitro ortamda geçişin incelenmesi için 0,5 ile 1,2,3,4,5,6. saatlerin sonunda alıcı solüsyonundan numune alındı ve aktif madde içeriği HPLC ile belirlendi. Domuz derisinden geçişin incelenmesi için 2,4,6,8,24. saatlerin sonunda alıcı solüsyonundan numune alındı ve aktif madde içeriği HPLC ile belirlendi. Reseptör solüsyonu olarak HCO-60: etanol: PBS (2:20:78, v/v/v) solüsyonu kullanıldı. RSV, CoQ10 ve VitE'nin suda çözünürlüğü düşük olduğundan aktif bileşiklerin penetrasyonunu arttırmak için HCO-60 ve etanol kullanıldı. Reseptör çözeltisinde resveratrolün çözünürlüğü 42 mg/ml, koenzim Q10'un çözünürlüğü 3 mg/ml, vitamin E'nin çözünürlüğü 20,5 mg/ml olarak bulundu. Tüm formülasyonlar arasında, üç aktif maddenin membrandan geçen eden miktarları en yüksek RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonuna aitti. En düşük geçen resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E miktarları RSV-CoQ10-VitE-Krem'de görüldü. Bu durum lipozomların deriye yüksek derecede nüfuz edebilme yeteneğinin bir sonucudur. Lipit bileşimleri ve yapıları bakımından biyolojik membranlarla olan benzerliklerinden dolayı lipozomlar, tutulan aktif maddelerin penetrasyonunu arttırırlar (44, 46).

Resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E'nin in vitro permeasyonu selüloz asetat membrandan ve domuz derisinden karşılaştırıldı (Tablo 36-59, Şekil 38-73). Üç aktif maddenin de permeasyonları için selüloz asetat membran ve domuz derisi karşılaştırıldığında; selüloz asetat membranın permeasyon katsayısı domuz derisinden daha yüksektir. Tez çalışmasında elde edilen salım verileri

değerlendirildiğinde, akı değerlerine bakıldığında; tüm formülasyonlar için selüloz asetat membranda domuz derisine göre daha yüksek akı gözlenmiştir. Bu durumun, stratum corneum'un bariyer özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Resveratrolün selüloz asetat membrandan ve domuz derisinden in vitro permeasyonu karşılaştırıldığında, selüloz asetat membrandan Fick Yasası'na göre, domuz derisinden Higuchi Kinetik Modeli'ne uygun olduğu görülmüştür. Transresveratrolün domuz derisinden permeasyonu, literatür ile uyumlu şekilde, RSV-Lipo için 0,974, RSV-CoQ10-VitE-Lipo için 0,9769 ve RSV-CoQ10-VitE-Krem için 0,8046 R^2 değerleri ile Higuchi Kinetik Modeli'ne uymaktadır (276). Akı (geçiş hızı) değerleri incelendiğinde, resveratrol için en yüksek akı değerleri (selüloz asetat membrandan Fick Yasası'na göre 326,97 mcg/cm^2/sa, domuz derisinden Higuchi Kinetik Modeli'ne göre 199,76 mcg/cm^2/sa) RSV-CoQ10-Vit-E-Lipo formülasyonuna aittir.

Koenzim Q10'un selüloz asetat membrandan ve domuz derisinden in vitro permeasyon verileri karşılaştırıldığında, selüloz asetat membrandan Fick Yasası'na (Tablo 4-50), domuz derisinden Higuchi Kinetik Modeli'ne (Tablo 4-51) uygun olduğu görülmüştür. Akı değerleri incelendiğinde, koenzim Q10 için en yüksek akı değerleri (selüloz asetat membrandan Fick Yasası'na göre 384,58 mcg/cm^2/sa, domuz derisinden Higuchi Kinetik Modeli'ne göre 277,99 mcg/cm^2/sa) RSV-CoQ10-Vit-E-Lipo formülasyonuna aittir.

Vitamin E'nin selüloz asetat membrandan ve domuz derisinden in vitro permeasyon verileri karşılaştırıldığında, selüloz asetat membrandan Fick Yasası'na (Tablo 4-58), domuz derisinden Higuchi Kinetik Modeli'ne (Tablo 4-59) uygun olduğu görülmüştür. Akı değerleri incelendiğinde, vitamin E için en yüksek akı değerleri (selüloz asetat membrandan Fick Yasası'na göre 381,32 mcg/cm^2/sa, domuz derisinden Higuchi Kinetik Modeli'ne göre 277,58 mcg/cm^2/sa) RSV-CoQ10-Vit-E-Lipo formülasyonuna aittir.

Antioksidan aktivite için DPPH radikal temizleme aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçüldü. In vitro permeasyon çalışmaları sonunda etken madde miktarı ve antioksidan etkisi belirlendi. Nashine ve ark., Trotta ve ark. yaptıkları çalışmalarda resveratrol formülasyonlarının DPPH serbest radikallerinin %50'sinden fazlasını temizleme aktiviteleri gösterdiğini bildirmişlerdir (80, 81).

Cervellati ve ark. CoQ10'un antioksidan aktivitesinin %50'den yüksek olduğunu bildirmiştir (82). Bu çalışmada, hem selüloz asetat zarından hem de domuz derisinden alınan salım numunelerinin, 24 saat sonra DPPH· radikalinin %50'sinden fazlasını temizleyebildiği görülmüştür (Tablo 4-60, Şekil 4-74). Sonuçlar daha önce yayınlanan verilerle uyumludur. Antioksidan etki sonuçlarına ilişkin olarak, lipozomal formülasyonlardan salınan numunelerin DPPH temizleme aktivitesi, antioksidan krem formülasyonundan daha yüksekti. Bu durum, lipozomal formülasyonlardan antioksidanların yeterli miktarda salındığını doğrulamaktadır. RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonunun antioksidan aktivitesi %90'ın üzerinde bulunmuştur. Domuz derisinden in vitro salım numunelerine ait antioksidan aktivite testinde, RSV-KoQ10-VitE-Krem'in DPPH süpürücü aktivitesi %21,48 ± 1,7, RSV-Lipo'nun %51,28 ± 2,4, CoQ10-Lipo'nun %52,45 ±0,9, VitE-Lipo'nun %55,30 ± 1,2, RSV-CoQ10-VitE-Lipo ise %81,36 ± 1,1 olarak bulunmuştur. Antioksidan aktivite sonuçları açısından RSV-CoQ10-VitE-Lipo diğer formülasyonlara göre anlamlı derecede yüksektir. RSV-CoQ10-VitE-Lipo'nun antioksidan aktivitesi, konvansiyonel kremin antioksidan aktivitesinin yaklaşık 4 katıdır. Ayrıca, RSV-CoQ10-VitE-Lipo'nun radikal süpürücü aktivitesi, diğer liposomal formülasyonlardan (RSV-Lipo, CoQ10-Lipo, VitE-Lipo) yaklaşık %50 daha fazladır. Bu durumun, aktif bileşiklerin kombinasyon halinde kullanıldıklarında artan antioksidan etkilerine bağlanabileceği düşünülmektedir. Kagan ve ark. koenzim Q10 ve E vitamininin antioksidan aktivitesinin sinerjistik olduğunu, bir araya geldiklerinde daha yüksek antioksidan etki gösterdiklerini göstermiştir. Lipit çift katmanda CoQ10 ve VitE birbirleriyle etkileşime girerler ve bu durum, VitE'nin geri dönüşümüyle sonuçlanır. Bu işlem sırasında bir süperoksit tüketilir. Bu nedenle CoQ10 ve VitE'nin antioksidan aktivitesi birleştirildiğinde artar (62). Resveratrolün lipozomlar halinde verilmesini takiben başka bir antioksidan (C vitamini) ile birleştirildiğinde antioksidan etkisini karşılaştıran yayınlanmış bir çalışmada yazarlar, RSV'nin radikal temizleme etkisinin C vitamini varlığında arttığını belirtmişlerdir (79). Benzer şekilde lipozomal formülasyondaki resveratrolün antioksidan etkisinin E vitamini eklenmesiyle arttığı bildirilmiştir (73). Bu çalışmada RSV-CoQ10-VitE-Lipo, deriye daha iyi geçiş ve yüksek antioksidan aktivite nedeniyle optimum formülasyon olarak seçilmiştir.

Optimum formülasyon olarak seçilen RSV-CoQ10-VitE-Lipo'nun yapısını analiz etmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Keseciklerin SEM görüntüleri, ortalama parçacık boyutu dağılım sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında resveratrol, koenzim Q10 ve vitamin E içeren lipozom formülasyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyon, resveratrol içeren lipozom (RSV-Lipo), koenzim Q10 içeren lipozom (CoQ10-Lipo), vitamin E içeren lipozom (VitE-Lipo) ve aynı antioksidan kombinasyonunu içeren konvansiyonel bir krem (RSV-CoQ10-VitE-Krem) ile in vitro rtamda karşılaştırılarak incelenmiştir. In vitro salım çalışması sonucunda, 6 saat sonrasında tüm etken maddeler için en yüksek miktarda geçişin RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonundan olduğu görülmüştür. Domuz derisinden in vitro salım çalışması verileri incelendiğinde, domuz derisinden geçen en yüksek antioksidan miktarının tüm aktif maddeler için RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonu ile gerçekleştirildiği saptanmıştır. Hazırlanan formülasyonların antioksidan aktiviteleri incelendiğinde, en yüksek DPPH radikal süpürücü aktivite RSV-CoQ10-VitE-Lipo formülasyonu geçiş örneklerinde görülmüştür. Domuz derisinden in vitro salım numunelerine ait antioksidan aktivite testinde, RSV-CoQ10-VitE-Lipo örneklerinin antioksidan aktivitesi konvansiyon kreme göre yaklaşık 4 kat daha fazla, diğer lipozomal formülasyonların (RSV-Lipo, CoQ10-Lipo, VitE-Lipo) DPPH aktivitelerine göre ise %50 daha fazladır. Bu verilere dayanarak, antioksidan maddelerin lipozomlara kapsüllenmesinin stabilitelerini arttırabileceği, derinin bariyer tabakasını aşmada daha etkili olacağı ve böylece daha yüksek antioksidan aktivite ile cilt yaşlanmasına karşı etki sağlanacağı öngörülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Zhang S, Duan E. Fighting against skin aging: the way from bench to bedside. *Cell Transplant* 2018, **27**(5): 729–738.

2. Ansary TM, Hossain MR, Kamiya K, Komine M, Ohtsuki M. Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *Int. J. Mol. Sci.* [serial online] 2021, **22**(8): 3974 (2021). Erişim 20.02.2022, https://doi.org/10.3390/ijms22083974.

3. Addor F. Antioxidants in dermatology. *An. Bras. Dermatol.* 2017. ***92***(3): 356–362.

4. Leis K, Pisanko K, Jundziłł A, Mazur E, Mêcińska-Jundzill K, Witmanowski H. Resveratrol as a factor preventing skin aging and affecting its regeneration. *Postepy. Dermatol. Alergol*. 2022. **39**(3): 439-445.

5. Gherardi G, Corbioli G, Ruzza F,Rizzuto R. CoQ_{10} and resveratrol effects to ameliorate aged-related mitochondrial dysfunctions. *Nutrients*. 2022. **14**(20), 4326.

6. Alonso C, Marti M, Barba C, Carrer V, Rubio L, Coderch L. Skin permeation and antioxidant efficacy of topically applied resveratrol. Arch. Dermatol. Res. 2017. 309(6): 423–431.

7. Arenas-Jal M, Sune-Negre JM, Garcia-Montoya E. Coenzyme Q10 supplementation: Efficacy, safety, and formulation challenges. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020. **19**(2): 574–594.

8. Richard C, Cassel S, Blanzat M. Vesicular systems for dermal and transdermal drug delivery. *RSC Advances*. 2021. **11**(1): 442–451.

9. Pasarin D, Ghizdareanu A-I, Enascuta CE, Matei CB, Bilbie C, Paraschiv-Palada L, Veres P-A. Coating Materials to Increase the Stability of Liposomes. *Polymers*. 2023, **15**(3):782.

10. Kagan VE, Fabisiak JP, Quinn PJ. Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma* 2000. **214**: 11–18.

11. Franz TJ. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. *J Invest Dermatol* 1975. **64**(3): 190–195.

12. Lehman PA, Raney SG, Franz TJ. Percutaneous Absorption in Man: In vitroin vivo Correlation. *Skin Pharmacol Physiol* 2011. **24**(4): 224–230.

13. Jung EC, Maibach HI. Animal models for percutaneous absorption. *J Appl Toxicol* 2015. **35**(1):1.

14. Simon GA, Maibach HI. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol Physiol* 2000. **13**(5): 229.

15. Boer M, Duchnik E, Maleszka R, Marchlewicz M. Structural and biophysical characteristics of human skin in maintaining proper epidermal barrier function. *Postepy dermatologii i alergologii* 2016. **33**(1): 1–5.

16. Ibrahim AAE, Bagherani N, Smoller BR., Reyes-Baron C, Bagherani N. *Functions of the Skin*. In: Smoller, B., Bagherani, N. (eds) Atlas of Dermatology, Dermatopathology and Venereology. Springer, Cham: https://doi.org/10.1007/978-3-319-45134-3_4-1.

17. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis* [web page on the Internet]. Erişim 18.11.2022: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2022: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/.

18. Lopez-Ojeda W, Pandey A, Alhajj M ve ark. *Anatomy, Skin (Integument)* [web page on the Internet]. Erişim 18.11.2022: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2022: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441980/.

19. Andersson T, Ertürk Bergdahl G, Saleh K, Magnúsdóttir H, Stødkilde K, Andersen CBF, Lundqvist K, Jensen A, Brüggemann H, Lood R. Common skin bacteria protect their host from oxidative stress through secreted antioxidant RoxP. *Sci Rep*. 2019, **9**(1):3596.

20. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2017, **25**(3):283-289.

21. Slominski AT, Manna PR, Tuckey RC. On the role of skin in the regulation of local and systemic steroidogenic activities. *Steroids*. 2015, **103**:72-88.

22. Zhang C, Merana GR, Harris-Tryon T, Scharschmidt TC, Skin immunity: dissecting the complex biology of our body's outer barrier, *Mucosal Immunol* 2022, **15**(4): 551-561.

23. Biggs LC, Kim CS, Miroshnikova YA, Wickström SA, Mechanical Forces in the Skin: Roles in Tissue Architecture, Stability, and Function, *J Invest Dermatol* 2020, **140**(2): 284-290.

24. Lee SH, Jeong SK, Ahn SK. An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J* 2006, **47**(3):293-306.

25. Agarwal S, Krishnamurthy K. *Histology, Skin* [web page on the Internet]. Erişim 18.11.2022: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing 2022: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537325/figure/article-32669.image.f1/.

26. Baumann L. Basic science of the Epidermis. *J. Cosmet. Dermatol.* Miami: The McGraw-Hill companies; 2002.

27. Pillai S, Cornell M, Oresajo C. Epidermal barrier. *J. Cosmet. Dermatol.* Durham: Wiley Blasckwell; 2010.

28. Johansen C. Generation and Culturing of Primary Human Keratinocytes from Adult Skin. *J. Vis. Exp.* 2017. **130**:56863.

29. Griffiths C Barker J Bleiker T Chalmers R Creamer D. *Rook's Textbook of Dermatology*. Ninth ed. Chichester West Sussex: John Wiley & Sons; 2016.

30. Sathananthan, Henry. Human Cell And Tissue Fine Structure For Teaching And Research In Stem Cells. 2015.

31. Tagami H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Inter J Cosmet Sci.* 2008; 30:413–34.

32. Fluhr JW, Dickel H, Kuss O, et al. Impact of anatomical location on barrier recovery, surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br J Dermatol.* 2002;146:770–6.

33. Gonzalez-Bravo A, Montero-Vilchez T, Arias-Santiago S, Buendia-Eisman A. The Effect of Sunscreens on the Skin Barrier. *Life*. 2022; 12(12):2083. https://doi.org/10.3390/life12122083

34. Camilion J V, Khanna S, Anasseri S ve ark. Physiological, Pathological, and Circadian Factors Impacting Skin Hydration. *Cureus* 2022; **14**(8): e27666. doi:10.7759/cureus.27666.

35. Wang Z, Man M, Li T, Elias PM, Mauro TM. Aging-associated alterations in epidermal function and their clinical significance. *Aging* 2020;**12**:5551-5565. doi:10.18632/aging.102946.

36. Pailler-Mattei C, Nicoli S, Pirot F, et al. A new approach to describe the skin surface physical properities in vivo. *Colloid Surf B Biointerfaces.* 2009;**68**:200–6.

37. Sobjanek M, Sokołowska-Wojdyło M, Barańska-Rybak W ve ark. Rola czynników hormonalnych w etiopatogenezie i terapii trądziku pospolitego. *Adv Dermatol Allergol.* 2006;**23**:266–72.

38. Youn SW, Na JI, Choi SY ve ark. Regional and seasonal variations in facial sebum secretions: a proposal for the definition of combination skin type. *Skin Res Technol.* 2005;**11**:189–95.

39. Chanda, A., Singh, G. Skin. In: Mechanical Properties of Human Tissues. Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials. Springer, Singapore, 2023. https://doi.org/10.1007/978-981-99-2225-3_2.

40. Murphrey MB, Miao JH, Zito PM. *Histology, Stratum Corneum.* StatPearls [web page on the Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513299/.

41. Hoober JK, Eggink LL. The Discovery and Function of Filaggrin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; **23**(3):1455. https://doi.org/10.3390/ijms23031455

42. Mahanty S and Setty SRG. Epidermal Lamellar Body Biogenesis: Insight Into the Roles of Golgi and Lysosomes. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; **9**:701950. doi: 10.3389/fcell.2021.701950

43. Vietri Rudan M and Watt FM. Mammalian Epidermis: A Compendium of Lipid Functionality. *Front. Physiol.* 2022; **12**:804824. doi: 10.3389/fphys.2021.804824.

44. Lefèvre-Utile A, Braun C, Haftek M, Aubin F. Five Functional Aspects of the Epidermal Barrier. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; **22**(21):11676. https://doi.org/10.3390/ijms222111676.

45. Knox S, O'Boyle NM. Skin lipids in health and disease: A review, *Chem. Phys. Lipids* 2021; **236**:105055. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105055.

46. Egawa G, Kabashima K. Skin Immunity: A new player in the dermiş *eLife* 2021;**10**:e68979.

47. Gerasymchuk M, Robinson GI, Vardinska N, Ayedun SA, Alozie SC, Robinson JW, Kovalchuk O, Kovalchuk I. Sex-Dependent Skin Aging and Rejuvenation Strategies. *Dermato*. 2023; **3**(3):196-223. https://doi.org/10.3390/dermato3030016.

48. Fowler J. Understanding the Role of Natural Moisturizing Factor in Skin Hydration. *Pract Dermatol* 2012:36-40.

49. Rosso JD, Zeichner J, Alexis A, Cohen D, Berson D. Understanding the Epidermal Barrier in Healthy and Compromised Skin: Clinically Relevant Information for the Dermatology Practitioner: Proceedings of an Expert Panel Roundtable Meeting. *J Clin Aesthet Dermatol* 2016;**9**(4 Suppl 1):S2-S8.

50. Qassem M, Kyriacou P. Review of Modern Techniques for the Assessment of Skin Hydration. *Cosmetics*. 2019; **6**(1):19. https://doi.org/10.3390/cosmetics6010019.

51. Évora AS, Adams MJ, Johnson SA, Zhang Z. Corneocytes: Relationship between Structural and Biomechanical Properties. *Skin Pharmacol Physiol* 2021; **34** (3): 146–161. https://doi.org/10.1159/000513054

52. Souto EB, Fangueiro J F, Fernandes AR, Cano A, Sanchez-Lopez E, Garcia ML, Severino P, Paganelli MO, Chaud MV, Silva AM. Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. *Heliyon* 2022 **8**(2): e08938. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08938.

53. Pan Y, Ma X, Zhao J, Yan S, Liu Q, Zhao H. The Interaction of Age and Anatomical Region Influenced Skin Biophysical Characteristics of Chinese Women. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2020; **13:**911–926. https://doi.org/10.2147/CCID.S286402.

54. Cravello B, Ferri A. Relationship between skin properties and environmental parameters. *Skin Res Technol.* 2008;**14**:180–6.

55. Boelsma E, van de Vijver L, Goldbohm A ve ark. Human skin conditions and its associations with nutrient concentrations in serum and diet. *Am J Clin Nutr.* 2003;**77**:348–55.

56. Schwab H, Flora J, Mayrovitz HN. Impacts of Skin Eccrine Glands on the Measured Values of Transepidermal Water Loss. *Cureus* 2022; **14**(12): e32266. https://doi.org/10.7759/cureus.32266.

57. Chiang C, Maibach HI. How many skin barriers haveth we: Percutaneous egression of ions?. *Skin Res Technol*. 2022; **28**: 382–387. https://doi.org/10.1111/srt.13119.

58. Kottner J, Lichterfeld-Kottner A, Blume-Peytavİ U. Transepidermal water loss in young and aged healthy humans: A systematic review and meta-analysis. Archives of dermatological research. 2013; **305**:315-323. doi:10.1007/s00403-012-1313-6.

59. Firooz A, Sadr B, Babakoohi S ve ark. Variation of biophysical parameters of the skin with age, gender, and body region. *Sci World J.* 2012;**2012**:386936.

60. Dawnson T, Gemmer C, DeAngelis Y ve ark. Dandruff and seborrheic dermatitis likely result from scalp barrier breach and irritation induced by Malassezia metabolites, particularly free fatty acids. *J Am Acad Dermatol.* 2005;**53**:49.

61. Brown TM, Krishnamurthy K. *Histology, Dermis.* StatPearls [web page on the Internet]. 2022. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535346/.

62. Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI. Characteristics of the Aging Skin. *Advances in wound care* 2013;**2**(1):5–10. https://doi.org/10.1089/wound.2011.0356.

63. Jia Q, Nash JF. Pathology of Aging Skin. Farage, M.A., Miller, K.W., Maibach, H.I. (eds) 2010.Textbook of Aging Skin. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-89656-2_28.

64. Green EM, Mansfield JC, Bell JS, Winlove CP. The structure and micromechanics of elastic tissue. *Interface Focus*. 2014;**4**(2):20130058.

65. Hoover E, Aslam S, Krishnamurthy K. *Physiology, Sebaceous Glands.* StatPearls [web page on the Internet]. 2022. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499819/

66. Kozlowska J, Kaczmarkiewicz A, Stachowiak N, Sionkowska A. Evaluation of Sebostatic Activity of *Juniperus communis* Fruit Oil and *Pelargonium graveolens* Oil Compared to Niacinamide. *Cosmetics*. 2017; 4(3):36. https://doi.org/10.3390/cosmetics4030036

67. Lovászi, M., Szegedi, A., Zouboulis, C. C., & Törőcsik, D. (2017). Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. *Dermato-endocrinology*, *9*(1), e1375636. https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1375636

68. Thormar H, Hilmarsson H. The role of microbidical lipids in host defense against pathogens and their potential as therapeutic agents. *Chem Phys Lipids.* 2007;150:1–11.

69. Lee HJ, Kim M. Skin Barrier Function and the Microbiome. *Int J Mol Sci* 2022;*23*(21), 13071. https://doi.org/10.3390/ijms232113071.

70. Yu Y-Q, Yang X, Wu X-F, Fan Y-B. Enhancing Permeation of Drug Molecules Across the Skin via Delivery in Nanocarriers: Novel Strategies for Effective Transdermal Applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;**9**:646554. doi: 10.3389/fbioe.2021.646554.

71. Hodge BD, Sanvictores T, Brodell RT. Anatomy, Skin Sweat Glands. [Updated 2022 Oct 10]. In: StatPearls [web page on the Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482278/.

72. Baker LB. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin, Tex.)* 2019;**6**(3), 211–259. https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1632145.

73. Yedikaya Ö, Badıllı FU. İn Vitro Deri Modelleri *Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi* 2021; **2021**:699–721. https://doi.org/10.33483/jfpau.930099.

74. Pereira MN, Nogueira LL, Cunha-Filho M, Gratieri T, Gelfuso GM. Methodologies to Evaluate the Hair Follicle-Targeted Drug Delivery Provided by Nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2023; **15**(7):2002. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15072002.

75. Bala P, Pal K, Jathar S. Transdermal Drug Delivery System (TDDS) - A Multifaceted Approach For Drug Delivery. *J. Pharm. Res.* 2015;**8**: 1805-1835.

76. van Hoogevest P, Fahr A. Phospholipids in Cosmetic Carriers. In: Cornier, J., Keck, C., Van de Voorde, M. (eds) 2019, *Nanocosmetics*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-16573-4_6.

77. Gorzelanny C, Mess C, Schneider SW, Huck V, Brandner JM. Skin Barriers in Dermal Drug Delivery: Which Barriers Have to Be Overcome and How Can We Measure Them?. *Pharmaceutics*, 2020;**12**(7):684. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070684.

78. Adepu S, Ramakrishna S.Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2021; **26**(19):5905. https://doi.org/10.3390/molecules26195905.

79. Cooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. *Cell Membranes*. Erişim: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9928/.

80. Yang R, Wei T, Goldberg H, Wang W, Cullion K, Kohane DS. Getting Drugs Across Biological Barriers. *Adv mater* 2017;**29**(37), doi:10.1002/adma.201606596.

81. Stillwell W. Membrane Transport. *An Introduction to Biological Membranes* 2016; **2016**:423–451. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63772-7.00019-1.

82. Iliopoulos F, Sil BC, Evans CL. The role of excipients in promoting topical and transdermal delivery: Current limitations and future perspectives. *Front. Drug. Deliv.* 2022; 2:1049848. doi: 10.3389/fddev.2022.1049848.

83. Parhi R, Mandru A. Enhancement of skin permeability with thermal ablation techniques: concept to commercial products. *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2021;**11**(3), 817–841. https://doi.org/10.1007/s13346-020-00823-3.

84. Alkilani AZ, Nasereddin J, Hamed R, Nimrawi S, Hussein G, Abo-Zour H, Donnelly RF. Beneath the Skin: A Review of Current Trends and Future Prospects of Transdermal Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics* 2022; **14**:1152. https://doi.org/10.3390/ pharmaceutics14061152.

85. Ramadon D, McCrudden MTC, Courtenay AJ, Donnelly RF. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2022; **12**(4), 758–791. https://doi.org/10.1007/s13346-021-00909-6.

86. Jeong WY, Kwon M, Choi HE ve ark. Recent advances in transdermal drug delivery systems: a review. *Biomater Res* 2021;**25**:24. https://doi.org/10.1186/s40824-021-00226-6.

87. Richard C, Cassel S, Blanzat M. Vesicular systems for dermal and Transdermal Drug Delivery. *RSC Advances* 2021;**11**(1):442–451. doi:10.1039/d0ra09561c.

88. Rehman K, Zulfakar MH. Recent Advances in Gel Technologies for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2013;**40**:433–440. doi: 10.3109/03639045.2013.828219.

89. Murth, SN. Approaches for Delivery of Drugs Topically. *AAPS PharmSciTech* 2020;**21**:30. https://doi.org/10.1208/s12249-019-1582-x.

90. Dragicevic N, Maibach HI. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects.* Springer; New York, NY, USA: 2015.

91. Schafer N, Balwierz R, Biernat P, Ochędzan-Siodłak W, Lipok J. Natural Ingredients of Transdermal Drug Delivery Systems as Permeation Enhancers of Active Substances through the Stratum Corneum. *Mol pharm* 2023;**20**(7), 3278–3297. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00126.

92. Khatoon M, Shah KU, Din FU, Shah SU, Rehman AU, Dilawar N, Khan AN. Proniosomes derived niosomes: recent advancements in drug delivery and targeting. *Drug delivery*, 2019;**24**(sup1): 56–69. https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1384520.

93. Virani A, Puri V, Mohd H, Michniak-Kohn B. Effect of Penetration Enhancers on Transdermal Delivery of Oxcarbazepine, an Antiepileptic Drug Using Microemulsions. *Pharmaceutics*. 2023; **15**(1):183. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010183.

94. Alkilani AZ, McCrudden MT, Donnelly RF. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics* 2015;**7**(4), 438–470. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics7040438.

95. Krutmann J, Bouloc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *J Dermatol Sci* 2017;**85**(3):152–161.

96. Mora Huertas AC, Schmelzer CE, Hoehenwarter W, Heyroth F, Heinz A. Molecular-level insights into aging processes of skin elastin. *Biochimie* 2016;**128–129**:163–173.

97. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Derm.-Endocrinol* 2012;**4**(3), 308–319. https://doi.org/10.4161/derm.22804.

98. Lee H, Hong Y, Kim M. Structural and Functional Changes and Possible Molecular Mechanisms in Aged Skin. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, **22**:12489. https://doi.org/10.3390/ijms222212489.

99. Harn HI, Chen CC, Wang SP, Lei M and Chuong CM. Tissue Mechanics in Haired Murine Skin: Potential Implications for Skin Aging. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;**9**:635340. doi: 10.3389/fcell.2021.635340.

100. Csekes E, Račková L. Skin Aging, Cellular Senescence and Natural Polyphenols. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;**22**(23), 12641. https://doi.org/10.3390/ijms222312641.

101. Victorelli S. ve ark. Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *The EMBO Journal* 2019;**38**(23): e101982.

102. Chandrashekar BS, Sarangi K, Mastim MA, Bhatia A, Shah M, Sharma V, Gupta M, Gutte R, Sharma A, Sakhalkar UA. Prospective Multicenter Study to Evaluate the Safety and Efficacy of the Topical Application of MYOWNN™, an Autologous Growth Factor Concentrate (AGFC) Serum, in Anti-Aging. *Cureus* 2022;**14**(5), e25190. https://doi.org/10.7759/cureus.25190.

103. Naylor EC, Watson RE, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011;**69**(3):249–256.

104. Khalid KA, Nawi AFM, Zulkifli N, Barkat MA, Hadi H. Aging and Wound Healing of the Skin: A Review of Clinical and Pathophysiological Hallmarks. *Life (Basel, Switzerland)*, 2022;**12**(12), 2142. https://doi.org/10.3390/life12122142.

105. Friedman O. Changes associated with the aging face. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2005;13(3):371–380.

106. Low E, Alimohammadiha G, Smith LA, Costello LF, Przyborski SA, von Zglinicki T, Miwa S. How good is the evidence that cellular senescence causes skin ageing?. *Ageing Res. Rev.* 2021;**71**,101456. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101456.

107. Zingkou E., Pampalakis G., Sotiropoulou G. (2022). Keratinocyte differentiation and proteolytic pathways in skin (patho) physiology. *Int. J. Dev. Biol.* 66: 269-275. https://doi.org/10.1387/ijdb.210161gs

108. Dos Santos, M., Michopoulou, A., André-Frei, V., Boulesteix, S., Guicher, C., Dayan, G., Whitelock, J., Damour, O., & Rousselle, P. (2016). Perlecan expression influences the keratin 15-positive cell population fate in the epidermis of aging skin. *Aging*, *8*(4), 751–768. https://doi.org/10.18632/aging.100928

109. Zargaran, D., Zoller, F., Zargaran, A., Weyrich, T., & Mosahebi, A. (2022). Facial skin ageing: Key concepts and overview of processes. *International journal of cosmetic science*, *44*(4), 414–420. https://doi.org/10.1111/ics.12779

110. Freitas-Rodríguez, S., A.R. Folgueras, and C. López-Otín, *The role of matrix metalloproteinases in aging: Tissue remodeling and beyond.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2017. **1864**(11, Part A): p. 2015-2025.

111. Bonta M, Daina L, Mutiu G. The process of ageing reflected by histological changes in the skin. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(Suppl 3):797–804.

112. Heinz, A., *Elastic fibers during aging and disease.* Ageing Research Reviews, 2021. **66**: p. 101255.

113. Scioli MG, Bielli A, Arcuri G, Ferlosio A, Orlandi A. Ageing and microvasculature. *Vasc Cell*. 2014;**6**:19.

114. Chen L, Hu JY, Wang SQ. The role of antioxidants in photoprotection: A critical review. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2012;**67**:1013–1024. doi: 10.1016/j.jaad.2012.02.009.

115. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 2015; **5**(2): 545–589. https://doi.org/10.3390/biom5020545.

116. Pfisterer K, Shaw LE, Symmank D, Weninger W. The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection. *Front Cell Dev Biol* 2021;**9**:682414. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.682414.

117. Marcos-Garcés V, Molina Aguilar P, Bea Serrano C, García Bustos V, Benavent Seguí J, Ferrández Izquierdo A, Ruiz-Saurí A. Age-related dermal collagen changes during development, maturation and ageing - a morphometric and comparative study. *J of anat* 2014; **225**(1), 98–108. https://doi.org/10.1111/joa.12186

118. Shin JW, Kwon SH, Choi JY, Na JI, Huh CH, Choi HR, Park KC. Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *International journal of molecular sciences* 2019;**20**(9), 2126. https://doi.org/10.3390/ijms20092126.

119. Heinz A. Elastic fibers during aging and disease. *Ageing res rev* 2021;**66**, 101255. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101255.

120. Baumann L, Bernstein EF, Weiss AS, Bates D, Humphrey S, Silberberg M, Daniels R. Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthet Surg J* 2021;**3**(3), ojab019. https://doi.org/10.1093/asjof/ojab019.

121. Seite S, Zucchi H, Septier D, Igondjo-Tchen S, Senni K, Godeau G. Elastinchanges during chronological and photo-ageing: the important role of lysozyme. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006:980-7.

122. Warraich UE, Hussain F, Kayani HUR. Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling. *Heliyon* 2020;**6**(5): e04107. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04107.

123. Iakovou E, Kourti M. A Comprehensive Overview of the Complex Role of Oxidative Stress in Aging, The Contributing Environmental Stressors and Emerging Antioxidant Therapeutic Interventions. *Front Aging Neurosci*, 2022;**14**:827900. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.827900.

124. Prasad A, Pospisil P. Ultraweak photon emission induced by visible light and ultraviolet a radiation via photoactivated skin chromophores: *In*

vivo charge coupled device imaging. *J. Biomed. Opt.* 2012 doi: 10.1117/1.JBO.17.8.085004.

125. Rittie L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;**5**(1):a015370.

126. Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*. 2015;**21**:16–29.

127. Packer L, Valacchi G. Antioxidants and the Response of Skin to Oxidative Stress: Vitamin E as a Key Indicator. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2002;**15**, 282 - 290.

128. Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA. ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019;**2019**:6175804. https://doi.org/10.1155/2019/6175804.

129. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, van Remmen H. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* 2007;**43**:477–503.

130. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 2003;**552**:335–344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478.

131. Sreedhar A, Aguilera-Aguirre L, Singh KK. Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell death dis* 2020;**11**(6), 444. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2649-z

132. Quan C, Cho MK, Perry D ve ark. Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: implication for human skin connective tissue aging. *J Biomed Sci* 2015;**22**:62. https://doi.org/10.1186/s12929-015-0167-6.

133. Panich U, Sittithumcharee G, Rathviboon N, Jirawatnotai S. Ultraviolet radiation-induced skin aging: The role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging. *Stem Cells Int*. 2016;**2016**:7370642.

134. Buckingham EM, Klingelhutz AJ. The role of telomeres in the ageing of human skin. *Exp Dermatol*. 2011;**20**(4):297–302.

135. Miwa S ve ark. Mitochondrial dysfunction in cell senescence and aging. *J. Clin. Investig.* 2022;**132**(13).

136. Breitenbach, M. Oxidative stress in health and disease. *MDPI AG* 2016.

137. Current advances of Dendrobium officinale polysaccharides in dermatology: a literature review [web page on the Internet]. Scientific Figure on ResearchGate. Erişim: 23.10.2022: https://www.researchgate.net/figure/Skin-aging-via-oxidative-mechanism-and-the-antiaging-effect-of-DOP-The-internal-cause-of_fig1_342879152.

138. Mane S ve ark. Skin anti-aging strategies: A Review," *Int. J. Appl. Sci. Eng.* 2019;**04**(07):255–263. https://doi.org/10.33564/ijeast.2019.v04i07.044.

139. Chaudhary M, Khan A, Gupta M. Skin Ageing: Pathophysiology and Current Market Treatment Approaches. *Curr. Aging Sci.* 2020;**13**(1), 22–30. https://doi.org/10.2174/1567205016666190809161115.

140. Zouboulis CC, Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Elewa R, Makrantonaki E, Aesthetic aspects of skin aging, prevention, and local treatment, *Clin Dermatol* 2019;**37**(4):365-372. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.04.002.

141. Baumann L. Skin ageing and its treatment. *J Pathol.* 2007;**211**:241–51. doi: 10.1002/path.2098.

142. Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as Ros-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2014;**2**. https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053.

143. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr j* 2016;**15**(1), 71. https://doi.org/10.1186/s12937-016-0186-5.

144. Tan BL, Norhaizan ME, Liew WP, Sulaiman Rahman H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front pharmacol* 2018;**9:**1162. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01162.

145. Shanbhag S, Nayak A, Narayan R, Nayak UY. Anti-aging and Sunscreens: Paradigm Shift in Cosmetics. *Adv. Pharm. Bull.* 2019;**9**(3), 348–359. https://doi.org/10.15171/apb.2019.042.

146. Varesi A, Chirumbolo S, Campagnoli LIM, Pierella E, Piccini GB, Carrara A, Ricevuti G, Scassellati C, Bonvicini C, Pascale A. The Role of Antioxidants in the Interplay between Oxidative Stress and Senescence. *Antioxidants*. 2022; **11**(7):1224. https://doi.org/10.3390/antiox11071224.

147. Oresajo C, Pillai S, Manco M, Yatskayer M, McDaniel D. Antioxidants and the skin: Understanding formulation and efficacy. *Dermatol ther* 2012;**25**:252-9. 10.1111/j.1529-8019.2012.01505.x.

148. Fremont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*. 2000;**66**:663-667.

149. Orallo F. Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr. Med. Chem.* 2006;**13**(1), 87–98.

150. Loss of trans-resveratrol during storage and ageing of red wines [web page on the Internet]. Scientific Figure on ResearchGate. Erişim: 23.10.2022: https://www.researchgate.net/figure/The-structural-formula-of-trans-resveratrol-and-cis-resveratrol_fig1_343099503.

151. Kavas G, Aribal-Kocatürk P, Büyükkağnici D. Resveratrol: Is There Any Effect on Healthy Subject? *Biological Trace Element Research* 2007:250–254.

152. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* 2010;**2**(12), 1231–1246. https://doi.org/10.3390/nu2121231.

153. Dunaway S, Odin R, Zhou L, Ji L, Zhang Y, Kadekaro A. Natural Antioxidants:Multiple Mechanisms to Protect Skin from Solar Radiation. *Front Pharmacol.* 2018:392.

154. Meng T, Xiao D, Muhammed A, Deng J, Chen L, He J. Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2021;**26**(1), 229. https://doi.org/10.3390/molecules26010229.

155. Ratz-Łyko Anna, Arct Jacek. Resveratrol as an active ingredient for cosmetic and dermatological applications: A review. *J Cosmet Laser Ther* 2018;**2018**:21. doi:10.1080/14764172.2018.1469767.

156. Stacchiotti A, Favero G, Rezzani R. *Resveratrol and SIRT1 Activators for the Treatment of Aging and Age-Related Diseases*. In (Ed.), Resveratrol - Adding Life to Years, Not Adding Years to Life [web page on the Internet]. 2018: IntechOpen: https://doi.org/10.5772/intechopen.78977.

157. Cameron D. *New study validates longevity pathway: Findings identify universal mechanism for activating anti-aging pathway*. Cambridge 2013.

158. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P ve ark. Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1α, *Cell* 2006;**127**(6):1109-1122. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.013.

159. Kobylka P, Kucinska M, Kujawski J, Lazewski D, Wierzchowski M, Murias M. Resveratrol Analogues as Selective Estrogen Signaling Pathway Modulators: Structure-Activity Relationship. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2022;**27**(20):6973. https://doi.org/10.3390/molecules27206973.

160. Stevenson S, Thornton J. Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clin Interv Aging* 2007;**2**(3), 283–297. https://doi.org/10.2147/cia.s798.

161. Farris P, Krutmann J, Li Y, McDaniel D, Krol Y. Resveratrol: A Unique Antioxidant Offering a Multi-Mechanistic Approach for Treating Aging Skin. *J Drugs Dermatol* 2013;**12**:1389-94.

162. Newton RA, Cook AL, Roberts DW, Leonard JH, Sturm RA. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthesis enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes. *J Invest Dermatol* 2007;**127**(9):2216-2227.

163. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug metab dispos* 2004;**32**(12), 1377–1382. https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885

164. Peñalva R, Morales J, González-Navarro CJ, Larrañeta E, Quincoces G, Peñuelas I, Irache JM. Increased Oral Bioavailability of Resveratrol by Its Encapsulation in Casein Nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2018;**19**(9): 2816. https://doi.org/10.3390/ijms19092816.

165. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin e in human health and some diseases. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 2014;**14**(2), e157–e165.

166. Michalak M, Pierzak M, Kręcisz B, Suliga E. Bioactive Compounds for Skin Health: A Review. *Nutrients* 2021;**13**(1), 203. https://doi.org/10.3390/nu13010203.

167. Bora J, Tongbram T, Mahnot N, Mahanta C, Badwaik LS, Chapter 14 - Tocopherol, Editor(s): Jasmeet Kour, Gulzar Ahmad Nayik, Nutraceuticals and Health Care, Academic Press, 2022;**2022**:259-278, ISBN 9780323897792, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89779-2.00008-9.

168. Aparecida Sales de Oliveira Pinto C ve ark. Vitamin E in human skin: Functionality and topical products *Vitamin E in Health and Disease - Interactions, Diseases and Health Aspects* 2021. https://doi.org/10.5772/intechopen.98336.

169. Sharifi-Rad M ve ark. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: Back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. *Front Physiol* 2020;**11**. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694.

170. Zappe K, Pointner A, Switzeny OJ, Magnet U, Tomeva E, Heller J, Mare G, Wagner KH, Knasmueller S, Haslberger AG. Counteraction of Oxidative Stress by Vitamin E Affects Epigenetic Regulation by Increasing Global Methylation and Gene Expression of *MLH1* and *DNMT1* Dose Dependently in Caco-2 Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018;**2018**:3734250. https://doi.org/10.1155/2018/3734250.

171. Rahman S, Bhatia K, Khan A, Kaur M, Firoz A, Rashid H, Athar M, Islam F, Raisuddin S. Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous

inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. *Chem. Biol. Interact.* 2008;**172**:195-205. 10.1016/j.cbi.2007.11.017.

172. Masaki H. *Antioxidants and Skin Aging.* In: Laher, I. (eds) Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014: https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_100.

173. Ichihashi M, Funasaka Y, Ohashi A, Chacraborty A, Ahmed NU, Ueda M, Osawa T. The inhibitory effect of DL-alpha-tocopheryl ferulate in lecithin on melanogenesis. *Anticancer Res.* 1999;**19**:3769–3774.

174. Manela-Azulay M, Bagatin E. Cosmeceuticals vitamins. *Clin. Dermatol.* 2009;**27**:469–474. doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.05.010.

175. Keen MA, Hassan I. Vitamin E in dermatology. *Indian. Dermatol. Online J.* 2016;**7**:311–315. doi: 10.4103/2229-5178.185494.

176. Butt H, Mehmood A, Ali M, Tasneem S, Tarar MN, Riazuddin S. Vitamin E preconditioning alleviates in vitro thermal stress in cultured human epidermal keratinocytes. *Life Sci.* 2019;**239**:116–972. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116972.

177. Varela-López A, Giampieri F, Battino M, Quiles JL. Coenzyme Q and Its Role in the Dietary Therapy against Aging. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 2016;**21**(3), 373. https://doi.org/10.3390/molecules21030373.

178. Hernández-Camacho JD ve ark. Coenzyme Q10 supplementation in aging and disease. *Front Physiol* 2018;9. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00044.

179. Dighe N, Pattan S, Gaware V, Hole M, Musmade D, Kale S, Waman S. CoQ10 A wonder enzyme: A review. *Pharma Chem.* 2010;2.

180. Knott A, Achterberg V, Smuda C, Mielke H, Sperling G, Dunckelmann K, Vogelsang A, Krüger A, Schwengler H, Behtash M ve ark. Topical treatment with coenzyme Q10-containing formulas improves skin's Q10 level and provides antioxidative effects. *BioFactors (Oxford, England)*, 2015;**41**(6), 383–390. https://doi.org/10.1002/biof.1239.

181. Choi C, Kim S, Shanmugam S, Baskaran R, Park J, Yong C, Choi H, Yoo B, Han K. Relative Bioavailability of Coenzyme Q10 in Emulsion and Liposome Formulations. Biomolecules & Therapeutics - *Bıomol Ther* 2010;18: 99-105. aoi:10.4062/biomolther.2010.18.1.099.

182. Valko M ve ark. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;**39**:44–84.

183. Ayunin Q, Miatmoko A, Soeratri W, Erawati T, Susanto J, Legowo D. Improving the anti-ageing activity of coenzyme Q10 through protransfersome-loaded emulgel. *Sci rep* 2022;**12**(1), 906. https://doi.org/10.1038/s41598-021-04708-4.

184. Elaimi A, Shoviantari F, Erawati T, Soeratri W. Skin Penetration of Coenzyme Q10 in Nanostructure Lipid Carriers Using Olive Oil and Cetyl Palmitate. *Int. J. Pharm. Clin. Res*. 2017;**9**. 10.25258/ijpcr.v9i2.8297.

185. Hoppe U, Bergemann J, Diembeck W, Ennen J, Gohla S ve ark. Coenzyme Q 10, a cutaneous antioxidant and energizer. *BioFactors (Oxford, England).* 1999;**9:**371-8. 10.1002/biof.5520090238.

186. Muta-Takada K, Terada T, Yamanishi H, Ashida Y, Inomata S, Nishiyama T, Amano S. Coenzyme Q10 protects against oxidative stress-induced cell death and enhances the synthesis of basement membrane components in dermal and epidermal cells. *BioFactors (Oxford, England)*, 2009;**35**(5):435–441. https://doi.org/10.1002/biof.56.

187. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, Bannerjee SK. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* 2012;**2**(1), 2–11. https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920.

188. Patra JK, Das G, Fraceto LF ve ark. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J Nanobiotechnol* 2018;**16**,71. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8.

189. Parveen S, Misra R, Saho S. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine* 2012; **8**:147–166.

190. Marcucci F, Lefoulon F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *DDT* 2004;**9**(5).

191. Suralkar AR ve ark. Liposomes as a novel drug delivery system', *GSC Biol. Pharm. Sci.* 2022;**20**(3):336–343. doi:10.30574/gscbps.2022.20.3.0372.

192. Bangham AD, Watkins JC, Standish MM. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965:238-252.

193. Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J. Lipid Research.* 1968:310-318.

194. Lasic DD. Applications of Liposomes. *Handbook of Biological Physics* 1995:491-519.

195. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, et al. Liposome: Classification, Preparation, and Applications. *Nanoscale Research Letters*. 2013:1-9.

196. Xing H, Hwang K, Lu Y. Recent Developments of Liposomes as Nanocarriers for Theranostic Applications. *Theranostics*. 2016:1336–1352.

197. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Front pharmacol* 2015;**6**:286. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286.

198. Zylberberg C, Matosevic S, Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. *Drug Delivery* 2016;23:1-11. doi:10.1080/10717544.2016.1177136.

199. Yurdakul A, Atav R. Lipozomlarin yapisi ve Siniflandirilmasi. *DergiPark* [serial online] 2007. Erişim: 24.10.2022: https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/218038.

200. Nakhaei P, Margiana R, Bokov DO, Abdelbasset WK, Jadidi MA, Varma RS, Marofi F, Jarahian M, Beheshtkhoo N. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;**9**,705886. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.705886

201. JM B, JL T, L. S. There Are Three Common Types of Membrane Lipids. *Biochemistry. 5th edition.* New york: W H Freeman; 2002.

202. Drescher S, van Hoogevest P. The Phospholipid Research Center: Current Research in phospholipids and their use in drug delivery. *Pharmaceutics* 2020;**12**(12):1235. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121235.

203. Libretexts (2022) *The phospholipid bilayer*, *Chemistry LibreTexts* [web page on the Internet] Libretexts. Erişim: 24.20.2022: https://chem.libretexts.org/Sandboxes/iLearn_Collaborative/Copy_of_DCW-Biology-Semester-1_Curated.imscc/01%3A_Course_Content/01%3A_Unit_2_-_Cells/01%3A_Week_5%3A_Cell_Structure_and_Function_Continued/03%3A_The_Phospholipid_BiLayer.

204. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochimica et biophysica acta*, 2011;**1811**(11): 637–647. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.009.

205. Amina W, Shelley J. Brain Tissue Lipidomics: Direct Probing Using Matrix-assisted Laser. *The AAPS Journal*. 2006: E391-E395.

206. Luchini A, Vitiello G. Mimicking the Mammalian Plasma Membrane: An Overview of Lipid Membrane Models for Biophysical Studies. *Biomimetics*. 2021; **6**(1):3. https://doi.org/10.3390/biomimetics6010003.

207. *Structure of the plasma membrane (article) Khan Academy*. Khan Academy [web page on the Internet] Erişim: 24.10.2022: https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/cell-structure-and-function/plasma-membranes/a/structure-of-the-plasma-membrane

208. Emami S, Azadmard-Damirchi S, Peighambardoust S, Valizadeh H, Hesari J. Liposomes as carrier vehicles for functional compounds in food sector, *J. Exp. Nanosci.* 2016;**11**(9): 737-759, doi: 10.1080/17458080.2016.1148273.

209. Le N, Cao VD, Nguyen T, Le T, Tran TT, Hoang Thi TT. Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;**20**(19):4706. https://doi.org/10.3390/ijms20194706.

210. Machado AR, de Assis LM, Machado MIR, de Souza-Soares LA. Importance of lecithin for encapsulation processes. *Afr. J. Food Sci.* 2014;**8**:176–183.

211. van Hoogevest P, Wendel A. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2014;**116**:1088–1107. doi: 10.1002/ejlt.201400219.

212. Lordan R, Tsoupras A, Zabetakis I. Phospholipids of animal and marine origin: Structure, function, and anti-inflammatory properties. *Molecules.* 2017;**22**:1964. doi: 10.3390/molecules22111964.

213. Nguyen TL, Nguyen TH, Nguyen DH. Development and in vitro evaluation of liposomes using soy lecithin to encapsulate paclitaxel. *Int. J. Biomater.* 2017;**2017**:1–7. doi: 10.1155/2017/8234712.

214. Wang FC, Acevedo N, Marangoni AG. Encapsulation of phytosterols and phytosterol esters in liposomes made with soy phospholipids by high pressure homogenization. *Food Funct.* 2017;**8**:3964–3969. doi: 10.1039/C7FO00905D.

215. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, Deng Y, A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian J. Pharm. Sci.* 2015;**10**(2): 81-98. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004.

216. Widayanti A, Elfiyani R, Lestari D. Effect of lecithin's concentration of entrapment vitamin E acetate liposomes using thin layers hydration method. *Advanced Science Letters* 2017;**23**(12):12510–12513. https://doi.org/10.1166/asl.2017.10804.

217. Hagen M, Baker M. Skin penetration and tissue permeation after topical administration of diclofenac. *Curr Med Res Opin.* 2017:1623-1634.

218. Vanić Ž. Phospholipid Vesicles for Enhanced Drug Delivery in Dermatology. *J Drug Discov Develop and Deliv.* 2014:2-9.

219. González-Rodríguez M, Rabasco A. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opin on Drug Deliv*. 2011:857-871.

220. Lombardo, D., & Kiselev, M. A. (2022). Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics, 14*(3), 543. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543.

221. Panday H, Rani R, Agarwal V. Liposome and Their Applications in Cancer Therapy. *Braz Arch Biol Technol* 2016:59. doi:10.1590/1678-4324-2016150477.

222. Yu B, Lee R, Lee L. Microfluidic methods for production of liposomes. *Methods Enzymol* 2009:129-41.

223. Akman Ö ve ark. *Lipozomlar - Baskent.edu.tr*. [web page on the Internet]. Erişim: 25.10.2022: http://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/464/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmpzsnm12/11.3.pdf.

224. Gubernator J. Active methods of drug loading into liposomes: Recent strategiesfor stable drug entrapment and increased in vivo activity. *Informa Healthcare*. 2011:565-80.

225. Šturm L, Poklar Ulrih N. Basic Methods for Preparation of Liposomes and Studying Their Interactions with Different Compounds, with the Emphasis on Polyphenols. *Int j mol sci* 2021;**22**(12), 6547. https://doi.org/10.3390/ijms22126547.

226. Dua JS, Rana AC, Bhandari AK. Liposome: Methods of Preparation andApplications. *Int J Pharm Sci Res* 2012:14-20.

227. Anderson M, Omri A. The Effect of Different Lipid Components on the In VitroStability and Release Kinetics of Liposome Formulations. *J Drug Deliv* 2004:33-9.

228. Berger N, Sachse A, Bender J, Schubert R, Brandl M. Filter extrusion of liposomes using different devices: Comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *Int. J. Pharm.* 2001;223:55-68. 10.1016/S0378-5173(01)00721-9.

229. Sahoo SK, Chapter 3 - Formulation and characterization of liposomes, Editor(s): C. Anandharamakrishnan, Sayantani Dutta, Liposomal Encapsulation in Food Science and Technology, *Academic Press* 2023:39-63. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823935-3.00010-2.

230. Anwekar H, Patel S, Singhai AK. Liposome- as drug carriers. *International Journal of Pharmacy & Life Sciences*. 2011:945-951.

231. Andra VVSN, Pammi SVN, Bhatraju LVKP ve ark. A Comprehensive Review on Novel Liposomal Methodologies, Commercial Formulations, Clinical Trials and Patents. *BioNanoSci.* 2022;**12**, 274–291. https://doi.org/10.1007/s12668-022-00941-x.

232. Alshawwa SZ ve ark. Nanocarrier Drug Delivery Systems: Characterization, Limitations, Future Perspectives and Implementation of Artificial Intelligence. *Pharmaceutics* 2022;14(4):883. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14040883.

233. Surianarayanan R, Shivakumar H, Vegesna N, Srivastava A. Effect of sample Concentration on the Characterization of Liposomes using Dynamic light Scattering Technique. *Pharm Methods.* 2016;7:1-5. doi:10.5530/phm.2016.7.11.

234. Lawrie A, Albanyan A, Cardigan RA, Mackie I, Harrison P. Microparticle sizing by dynamic light scattering. *Vox sanguinis.* 2009;96:206-12. doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01151.x.

235. Wang DY, van der Mei HC, Ren Y, Busscher HJ, Shi L. Lipid-Based Antimicrobial Delivery-Systems for the Treatment of Bacterial Infections. *Frontiers in chemistry* 2020;**7**: 872. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00872.

236. GMP guide for manufacturing plants of human medicinal products. 2022.

237. Gregoriadis G. *Liposome Technology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2011.

238. Yadav AV, Murthy MS, Shete AS, Sakhare S. Stability aspects of liposome. *Indian. J. Pharm. Educ.* 2011;**45**:402-413.

239. Alonso-Estrada D, Ochoa-Viñals N, Pacios-Michelena S, Ramos-González R, Núñez-Caraballo A, Michelena Álvarez LG, Martínez-Hernández JL, Neira-Vielma AA, Ilyina A. No Solid Colloidal Carriers: Aspects Thermodynamic the Immobilization Chitinase and Laminarinase in Liposome. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2022;**9**:793340. doi: 10.3389/fbioe.2021.793340.

240. Supe SM, Takudage PJ. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. *Skin Res Technol.* 2021;**27**:299–308. https://doi.org/10.1111/srt.12968.

241. Supe S, Takudage S. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. Skin Res Technol 2020;**27**(3):299-308.

242. Salamanca CH, Barrera-Ocampo A, Lasso JC, Camacho N, Yarce CJ. Franz Diffusion Cell Approach for Pre-Formulation Characterisation of Ketoprofen Semi-Solid Dosage Forms. *Pharmaceutics* 2018;**10**(3): 148. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030148.

243. European Comission, "Ban on animal testing," Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs - European Commission. 05.07.2016. Erişim 17.02.2020: https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/animal-testing_en 17, 2020.

244. Shiow FN, Jennifer R, Dominic S, Eccleston G. A Comparative Study of Transmembrane Diffusion and Permeation of Ibuprofen across Synthetic Membranes Using Franz Diffusion Cells. *Pharmaceutics*. 2010:209-223.

245. Abd E, Yousuf SA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S, Grice JE, Roberts MS. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin Pharmacol*. 2016;**8**:163-176. https://doi.org/10.2147/CPAA.S64788.

246. Baert B, Boonen J, Burvenich C, Roche N, Stillaert F, Blondeel P, Van Boxclaer J, De Spiegeleer B. A new discriminative criterion for the development of Franz diffusion tests for transdermal pharmaceuticals. *J Pharm Pharm Sci* 2010;**13**(2), 218–230. https://doi.org/10.18433/j3ws33.

247. Knoke S, Bunjes H. Transfer Investigations of Lipophilic Drugs from Lipid Nanoemulsions to Lipophilic Acceptors: Contributing Effects of Cholesteryl

Esters and Albumin as Acceptor Structures. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 2021;**14**(9), 865. https://doi.org/10.3390/ph14090865.

248. Harris DC, Lucy CA. *Quantitative chemical analysis*, Ninth edition. New York: W.H. Freeman & Company, 2016.

249. Neupane R, Boddu S, Renukuntla J, Babu RJ, Tiwari AK. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics* 2020;**12**(2), 152. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020152.

250. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies*. Elsevier, 2016.

251. Baker RW. Membrane Separatıon. *Handbook of Industrial Membranes*; 2015.

252. Debeer S, Le Luduec JB, Kaiserlian D, Laurent P, Nicolas JF, Dubois B, Kanitakis J. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. *Eur. J. Dermatol.* 2013;**23**:456–466, doi:10.1684/ejd.2013.2060.

253. Sintov A. Cumulative evidence of the low reliability of frozen/thawed pig skin as a model for in vitro percutaneous permeation testing. *Eur J Pharm Sci* 2017;102. doi:10.1016/j.ejps.2017.03.024.

254. Uchida T, Kadhum WR, Kanai S, Todo H, Oshizaka T, Sugibayashi K. Prediction of skin permeation by chemical compounds using the artificial membrane, Strat-M™. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015:**67**, 113–118.

255. Mehrer H, Stolwijk NA. Heroes and highlights in the history of diffusion. 2015.

256. Tırnaksız F. Difüzyon. *Modern Farmasötik Teknoloji*. Ankara: TEB Eczacılık Akademisi; 2009.

257. Ng SF, Rouse JJ, Sanderson FD, Meidan V, Eccleston GM. Validation of a static Franz diffusion cell system for in vitro permeation studies. AAPS PharmSciTech. 2010;**11**(3):1432-41. doi: 10.1208/s12249-010-9522-9.

258. Bruschi ML. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. Woodhead Publishing. 2015:63-86. doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9.

259. Paarakh MP, Preethy AJ, Setty CM, Christoper GVP, Release Kinetics: Concepts And Applications, *Int. J. Pharm. Res.* 2018; **8**(1): 12-20. doi: 10.31838/ijprt/08.01.02.

260. Suvakanta D, Murthy PN, Lilakanta N, Prasanta C. Kinetic Modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica.* 2010;**67**(3):217-223.

261. Datta M, Kaur M. Diclofenac Sodium Adsorption onto Montmorillonite: Adsorption Equilibrium Studies and Drug Release Kinetics. *Adsorp Sci Technol.* 2014;**32**(5), 120-129.

262. da Rocha Lindner G, Khalil NM, Mainardes RM. Resveratrol-loaded polymeric nanoparticles: validation of an HPLC-PDA method to determine the drug entrapment and evaluation of its antioxidant activity. *Sci. World J.* 2013; **2013**:506083. https://doi.org/10.1155/2013/506083.

263. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [web page on the Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Erişim: 24.11.2022: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/

264. Refai H, Hassan D, Abdelmonem R. Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug delivery* 2017;**24**(1), 278–288. https://doi.org/10.1080/10717544.2016.1247925.

265. Liang N, Kitts D. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2014;**19**: 19180-19208. doi:10.3390/molecules191119180.

266. Arora D, Khurana B, Nanda S, Statistical development and *in vivo* evaluation of resveratrol-loaded topical gel containing deformable

vesicles for a significant reduction in photo-induced skin aging and oxidative stress. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2020;**46**(11), 1898-1910.

267. Caddeo C, Lucchesi D, Fernàndez-Busquets X, Valenti D, Penno G, Fadda AM, Pucci L. Efficacy of a resveratrol nanoformulation based on a commercially available liposomal platform. *Int. J. Pharm*. 2021;**608**:121086.

268. Lee WC, Tsai TH. Preparation and characterization of liposomal coenzyme Q10 for in vivo topical application, *Int. J. Pharm*. 2010;**395**(1-2): 78-83.

269. Gokce EH, Korkmaz E, Tuncay-Tanrıverdi S, Dellera E, Sandri G, Bonferoni MS, Ozer O. A comparative evaluation of coenzyme Q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers. *Int J Nanomedicine* 2012;**7**:5109-5117.

270. Shaw TK, Paul P, Chatterjee B. Research-based findings on scope of liposome-based cosmeceuticals: an updated review. *Futur. J. Pharm. Sci.* 2022;**8**: 46.

271. Montenegro L. Nanocarriers for skin delivery of cosmetic antioxidants. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 2014;**2**(4): 73-92.

272. Ravikumar P. Liposomes as carriers in skin ageing, *International J. Pharm. Sci. Res.* 2014;**6**: 1-7.

273. Sonam KS, Guleria S. Synergistic antioxidant activity of natural products, *Ann. Pharmacol. Pharm.* 2017;**2**(16): 1086.

274. Kenchappa V, Wahl M, Heinle H. Liposomes as carriers of resveratrol and vitamin E: Evaluating ameliorative antioxidant effect using chemical and cellular test systems. *Int J Vitam Nutr Res* 2020;**92**(5-6), 342-348.

275. Urano S, Kitahara M, Kato Y, Hasegawa Y, Matsuo M. Membrane stabilizing effect of vitamin E: existence of a hydrogen bond between *α*-tocopherol and phospholipids in bilayer liposomes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*1990;**36**(6):513–519.

276. de Almeida PA, Alves MC, Polonini HC, et al. Studies with emulsion containing trans-resveratrol: in vitro release profile and ex vivo human skin

permeation. *Curr Drug Deliv.* 2015;**12**(2):157-165. doi:10.2174/1567201812666150130161736.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

RESVERATROL, KOENZİM Q10 VE VİTAMİN E İÇEREN LİPOZOM HAZIRLANMASI VE YAŞLANMA KARŞITI ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO TEST EDİLMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%18	%17	%0	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	%6
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%3
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%2
4	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
5	Submitted to TechKnowledge Öğrenci Ödevi	%1
6	09ac859f-21d1-4d36-8f64-a4f1c989a42e.filesusr.com İnternet Kaynağı	%1
7	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.ijsr.net İnternet Kaynağı	<%1