



**BİTKİSEL KÖKENLİ BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN *IN VITRO* VE
IN SILICO DENEY MODELLERİ İLE CİLT LEKESİ GİDERİCİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ VE KOZMETİK FORMÜLASYON
TASARLANMASI**

Meltem KARAKÜÇÜK

**DOKTORA TEZİ
FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Meltem KARAKÜÇÜK

29/05/2024

BİTKİSEL KÖKENLİ BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN *IN VITRO* VE *IN SILICO*
DENEY MODELLERİ İLE CİLT LEKESİ GİDERİCİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ
VE KOZMETİK FORMÜLASYON TASARLANMASI

(Doktora Tezi)

Meltem KARAKÜÇÜK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2024

ÖZET

Bu tez kapsamında, tıbbi bitkilerde yaygın olarak bulunan çeşitli kimyasal gruplardan 36 adet fenolik bileşik seçilerek, cilt lekesini giderici/cilt rengini açıcı etkileri ile ciltte kırışıklık giderici etkisi belirlenmiştir. Ön taramada yer almasına karar verilen 36 adet fenolik bileşiğin, öncelikle ELISA mikrotiter *in vitro* enzim inhibisyon yöntemleri kullanılarak, tirozinaz (TYR), elastaz, kolajenaz ve ksantin oksidaz inhibitör etkileri tayin edilmiştir. TYR'a karşı inhibitör etkili olduğu belirlenen bileşikler *in silico* ortamda moleküler kenetlenme deneylerine tabi tutulmuştur. Bu kapsamda moleküler modelleme ile enzim-ligant ilişkisi moleküler düzeyde saptanmıştır. Ayrıca inhibitör fenolik bileşikler için SKMEL-3 insan malignan melanoma hücre hattında sitotoksite testi de yapılmıştır. *In vitro* ve *in silico* deneyler sonucunda en aktif bulunan bileşiklerden hareketle, cilt lekelerini gidermeye ve cilt rengini açmaya yönelik çeşitli kozmetik formülasyon kombinasyonları tasarlanmış ve en uygun kombinasyon olarak fisetin: kersetin (1:1) içeren nanoemüljel formülasyonu geliştirilmiştir. Nanoemüljel formülasyonu iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) deneysel modeller ile test edilmiştir. Nanoemüljel formülasyonunun 2D modelleri ile HaCaT keratinosit hücrelerinde hücre canlılığına etkisi ile lusiferaz yöntemi ile NF-κB indüksiyonu üzerinden anti-enflamatuvar etkisi incelenmiştir. 3D cilt modelleri ile yeniden yapılandırılmış insan epidermis hücreleri üzerinde EpiCS® yöntemi ile cilt üzerine korozyon etkisi incelenmiş ve her iki modelde de nanoemüljel formülasyonunun epidermise hasar verici etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca nanoemüljel formülasyonunun cilt rejenerasyonu üzerine etkisi ile anti-enflamatuvar etkisi çeşitli sitokinler ve kemokinlere karşı xMAP Luminex teknolojisi ile incelenmiştir. Tezimiz kapsamında, ilk defa özellikle cilt lekelerine yönelik olarak fisetin: kersetin (1:1) içeren nanoemüljel formülasyonu geliştirilmiş ve ulusal patent başvurusunda bulunulmuştur.

Bilim Kodu : 1017
Anahtar Kelimeler : Fenolik bileşik, tirozinaz, cilt lekesi giderici etki, kozmetik formülasyon, hiperpigmentasyon, enzim inhibisyonu, nanoemüljel
Sayfa Adedi : 106
Danışman : Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN

INVESTIGATION OF SKIN BLEMISH REMOVAL EFFECTS OF SOME PHENOLIC
COMPOUNDS OF PLANT ORIGIN BY *IN VITRO* AND *IN SILICO* EXPERIMENTAL
MODELS AND DESIGN OF COSMETIC FORMULATION

(Ph.D. Thesis)

Meltem KARAKÜÇÜK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

May 2024

ABSTRACT

Within the scope of this thesis, 36 phenolic compounds were selected from various chemical groups commonly found in medicinal plants, and their skin blemish-removing/skin-lightening effects and anti-wrinkle effects were determined. *In vitro* tyrosinase (TYR), elastase, collagenase and xanthine oxidase inhibitory effects were determined by using ELISA microtiter enzyme inhibition methods. The compounds determined to have inhibition against TYR were subjected to molecular docking experiments *in silico*. In this context, the enzyme-ligand relationship was determined at the molecular level by molecular modeling. In addition, the cytotoxicity test was performed for inhibitory phenolic compounds in the SKMEL-3 human malignant melanoma cell line. Based on the most active compounds found as a result of *in vitro* and *in silico* experiments, various cosmetic formulation combinations were designed to remove skin blemishes and lighten skin color, and a nanoemulgel formulation containing fisetin: quercetin (1:1) was developed. The nanoemulgel formulation was tested with two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) experimental models. The effect of the nanoemulgel formulation on cell viability in HaCaT keratinocyte cells with 2D models and its anti-inflammatory effect *via* NF- κ B induction by luciferase method were investigated. The corrosion effect on the skin was examined by EpiCS[®] method on reconstructed human epidermis cells with 3D skin models and the nanoemulgel formulation was determined not to have damaging effects on the epidermis in both models. In addition, the effect of nanoemulgel formulation on skin regeneration and its anti-inflammatory effect was examined against various cytokines and chemokines with xMAP Luminex technology. Within the scope of our thesis, for the first time, a nanoemulgel formulation containing fisetin: quercetin (1:1) for skin spots was developed and a national patent application was filed.

Science Code : 1017
Key Words : Phenolic compound, tyrosinase, skin spot removal,
cosmetic formulation, hyperpigmentation, enzyme
inhibition, nanoemulgel
Page Number : 106
Supervisor : Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmasının yanı sıra akademik ve kişisel gelişimime katkıda bulunan, bilgi, tecrübe ve deneyimlerinden faydalanmamı sağlayan, desteklerini esirgemeyen değerli danışman Hocam Prof. Dr. İlkey ERDOĞAN ORHAN'a tüm emekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bilimsel tecrübelerini, bilgi ve önerilerini benimle paylaşan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli Hocam, Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Fatma Sezer ŞENOL DENİZ'e, Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Esra AKKOL'a ve Farmakognozi Anabilim Dalındaki hocalarıma, çalışmalarım sırasında desteklerini benden esirgemeyen, doktora tez izleme komitesi (TİK) üyesi Sayın Hocalarım Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. İpek SÜNTAR ve Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

Nanaoemüljel formülasyonumuzun 2 ve 3 boyutlu cilt modellerinde etkinliğinin test edilmesinde destek olan Avusturya İlaç Araştırma Enstitüsü (ADSI) Başkanı Prof. Dr. K. Günther Bonn ile Başkan Yardımcısı Dr. Thomas Jakschitz'e teşekkürlerimizi sunarız.

Kozmetik formülasyon çalışmalarında sağladığı destekler için Doç. Dr. Samet ÖZDEMİR'e, moleküler kenetlenme deneyleri esnasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Gökçen EREN'e ve sitotoksisite testi deneyleri esnasında destekleri için Doç. Dr. Esra EMERCE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her zaman bana destek olan canım annem, babam ve kardeşlerim Erdem ve Görkem'e, akademik olarak örnek aldığım ve tavsiyeleri ile yol gösteren canım eşim, Ankara Medipol Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Alptuğ Eren KARAKÜÇÜK'e ve sevgi dolu kalbiyle en büyük destekçim ve hayatımın neşesi, bir tanem kızım Nil Zeynep'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın bir kısmını 02/2019-31 kodlu proje ile destekleyen Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| İÇİNDEKİLER | vii |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ..... | x |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ..... | xii |
| RESİMLERİN LİSTESİ | xiv |
| SİMGELER VE KISALTMALAR..... | xv |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 2.1. Derinin Yapısı | 5 |
| 2.2. Cilt ve Yaşlanma Süreci..... | 7 |
| 2.2.1. Oksidatif stres | 11 |
| 2.3. Hiperpigmentasyon | 12 |
| 2.3.1. Melanogenez..... | 13 |
| 2.3.2. Hiperpigmentasyon Tedavisi..... | 16 |
| 2.4. Fenolik Bileşikler | 18 |
| 2.5. Tirozinaz (TYR)..... | 21 |
| 2.5.1. TYR inhibitörleri | 22 |
| 2.6. Elastaz | 30 |
| 2.7. Kolajenaz..... | 31 |
| 2.8. Ksantin Oksidaz (XO)..... | 31 |
| 2.9. Cilt Rengini Açıcı ve Cilt Lekesini Giderici Etkiye Sahip Kozmetik Ürünlerde Kullanılan Formülasyonlar ve Nanoemülsiyonlar | 32 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 39 |
| 3.1. Gereç | 39 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Yöntemler..... | 45 |
| 3.2.1. TYR inhibisyonu tayini | 45 |
| 3.2.2. Elastaz inhibisyonu tayini..... | 46 |
| 3.2.3. Kolajenaz inhibisyonu tayini | 46 |
| 3.2.4. XO inhibisyonu tayini | 47 |
| 3.2.5. Antioksidan aktivite testleri..... | 48 |
| 3.2.6. Moleküler kenetlenme deneyleri | 49 |
| 3.2.7. Sitotoksisite testi..... | 50 |
| 3.2.8. Kozmetik formülasyon geliştirme çalışmaları..... | 51 |
| 3.2.9. Nanoemüljel formülasyonunun cilt üzerine etkilerinin test edilmesi..... | 52 |
| 4. BULGULAR | 57 |
| 4.1. TYR İnhibisyonuna Ait Bulgular | 57 |
| 4.1.1. Etkili bileşik kombinasyonlarının TYR inhibisyonuna ait bulgular..... | 58 |
| 4.2. Elastaz İnhibisyonuna Ait Bulgular | 59 |
| 4.3. Kolajenaz İnhibisyonuna Ait Bulgular..... | 60 |
| 4.4. XO İnhibisyonuna Ait Bulgular | 60 |
| 4.5. Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulgular..... | 61 |
| 4.5.1. DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi | 62 |
| 4.5.2. FRAP yöntemi | 63 |
| 4.5.3. CUPRAC yöntemi | 64 |
| 4.6. Moleküler Kenetlenme Deneylerine Ait Bulgular | 65 |
| 4.7. Sitotoksisite Analizine Ait Bulgular | 66 |
| 4.8. Kozmetik Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular..... | 67 |
| 4.8.1. Nanoemülsiyonların kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları | 67 |
| 4.9. Nanoemüljel Formülasyonunun Cilt Üzerine Etkilerinin Test Edilmesine ait Sonuçlar..... | 75 |
| 5. TARTIŞMA | 79 |

| | Sayfa |
|----------------------------|--------------|
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 87 |
| KAYNAKLAR..... | 89 |
| ÖZGEÇMİŞ | 105 |

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge | Sayfa |
|--|--------------|
| Çizelge 2.1. Çalışmalarımızda test edilen fenolik bileşikler ve kimyasal grupları..... | 20 |
| Çizelge 2.2. Kozmesötiklerde kullanılan cilt beyazlatıcı ajanlar, kullanım oranları, formülasyonları ve etki mekanizmaları..... | 33 |
| Çizelge 2.3. Nanoemülsiyon-bazlı kozmetik formülasyonlar..... | 37 |
| Çizelge 3.1. Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları..... | 39 |
| Çizelge 4.1. Tez gereçlerini teşkil eden fenolik bileşiklerin TYR inhibitör etkileri..... | 57 |
| Çizelge 4.2. Etkili bileşiklerin TYR'a karşı IC ₅₀ değerleri..... | 58 |
| Çizelge 4.3. Hazırlanan ikili kombinasyonların (1:1) TYR inhibitör etkileri..... | 58 |
| Çizelge 4.4. Hazırlanan üçlü kombinasyonların (1:1:1) TYR inhibitör etkileri..... | 59 |
| Çizelge 4.5. Seçilen fenolik bileşiklere ait elastaz inhibisyonu sonuçları..... | 60 |
| Çizelge 4.6. Fenolik bileşiklere ait kolajenaz inhibisyonu sonuçları..... | 60 |
| Çizelge 4.7. Fenolik bileşiklere ait XO inhibisyonu sonuçları..... | 60 |
| Çizelge 4.8. Fenolik bileşiklere ait DPPH radikal süpürücü etki sonuçları..... | 62 |
| Çizelge 4.9. Fenolik bileşiklere ait FRAP yöntemi antioksidan etki tayini sonuçları..... | 63 |
| Çizelge 4.10. Fenolik bileşiklere ait CUPRAC yöntemi antioksidan etki tayini sonuçları..... | 64 |
| Çizelge 4.11. SKMEL 30 hücrelerine 72 saat maruz bırakılan fenolik bileşikler ve kombinasyonlarının sitotoksikite değerlendirmesi ile hesaplanan IC ₅₀ değerleri..... | 66 |
| Çizelge 4.12. Kersetin ve fisetin içeren nanoemülsiyona ait fiziksel stabilite sonuçları (25 °C ± 2 °C, %60 RN ± %5)..... | 68 |
| Çizelge 4.13. Nanoemülsiyonların hazırlanmasında deney düzeni ve bağlı parametre sonuçları..... | 69 |
| Çizelge 4.14. Nanoemülsiyonların damlacık büyüklüğü (DB) ve PDI için tanımlayıcı istatistikleri..... | 69 |
| Çizelge 4.15. DS için bağımsız değişkenlerin etkileşimleri..... | 70 |
| Çizelge 4.16. DS dağılımı için bağımsız değişkenlerin etkileşimleri..... | 72 |

| Çizelge | Sayfa |
|---|--------------|
| Çizelge 4.17. Sitokin ve kemokine karşı nanoemüljel formülasyonumuzun cilt rejenerasyonu sağlayıcı ve ciltteki enflamasyona karşı etkisi..... | 75 |

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| Şekil 2.1. İçsel ve dışsal yaşlanmanın biyokimyasal yolağı | 9 |
| Şekil 2.2. Melanogenez mekanizması..... | 14 |
| Şekil 2.3. Melanogenez sırasında melanositlerden melanin sentezi | 15 |
| Şekil 2.4. Melanogenez sinyal yolağı | 16 |
| Şekil 2.5. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması..... | 18 |
| Şekil 2.6. Melanin biyosentezi döngüsü | 22 |
| Şekil 2.7. Hidrokinon kimyasal yapısı..... | 24 |
| Şekil 2.8. Arbutinin kimyasal yapısı..... | 26 |
| Şekil 2.9. α -Kojik asitin kimyasal yapısı..... | 28 |
| Şekil 2.10. Azelaik asit kimyasal yapısı | 29 |
| Şekil 2.11. Yağ içinde su ve su içinde yağ tiplerinde nanoemülsiyonlar | 34 |
| Şekil 2.12. Nanoemülsiyonların hazırlama yöntemleri..... | 35 |
| Şekil 3.1. <i>In vitro</i> 3D cilt modelleri | 54 |
| Şekil 4.1. TYR enzim bölgesinde (PDB kodu: 2Y9X) kersetin (A), fisetin (B), EGCG (C) ve pelargonidin (D) için belirlenen bağlantı konformasyonları (Hidrojen bağları sarı, π - π etkileşimleri turkuaz, π -katyon etkileşimleri ise kırmızı kesikli çizgilerle gösterilmiştir). | 66 |
| Şekil 4.2. TYR inhibitörü olan fenolik bileşiklere ait sitotoksosite grafikleri (F: Fisetin, Q: Kersetin, E: EGCG, P: Pelargonidin)..... | 67 |
| Şekil 4.3. Hint yağı – PEG etkileşim grafiği | 70 |
| Şekil 4.4. Hint yağı – Tween 80 etkileşim grafiği | 71 |
| Şekil 4.5. Hint yağı – PEG 3D yüzey grafiği (DS)..... | 71 |
| Şekil 4.6. Hint yağı – Tween 80 3D yüzey grafiği (DS)..... | 72 |
| Şekil 4.7. PEG – Tween 80 3D yüzey grafiği (DS)..... | 72 |
| Şekil 4.8. Hint yağı – PEG 3D yüzey grafiği (PDI)..... | 73 |
| Şekil 4.9. Hint yağı – Tween 80 3D yüzey grafiği (PDI) | 73 |

| Şekil | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 4.10. PEG – Tween 80 3D yüzey grafiği (PDI)..... | 74 |
| Şekil 4.11. Nanoemüljel formülasyonumuzun 2D modelinde canlılık testi sonuçları (WFA: Withaferin A, ILK: Nanoemüljel formülasyonu)..... | 76 |
| Şekil 4.12. Nanoemüljel formülasyonumuzun anti-enflamatuvar potansiyeli (WFA: Withaferin A, ILK: Nanoemüljel formülasyonu) | 76 |
| Şekil 4.13. Nanoemüljel formülasyonumuzun EpiC'lerle 3D modelde canlılık (Epidermis Modeli, 6 saatlik tedaviden sonra) testi sonuçları (WFA: Withaferin A, ILK: Nanoemüljel formülasyonu) | 77 |
| Şekil 4.14. Korozyon testi (OECD kılavuzu) (KOH: Potasyum hidroksit, ILK: Nanoemüljel formülasyonu) | 77 |
| Şekil 5.1. Tezimiz kapsamında yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi | 82 |

RESİMLERİN LİSTESİ

| Resim | Sayfa |
|--|--------------|
| Resim 2.1. Derinin katmanları | 5 |
| Resim 2.2. Cilt yapısında yaşlanma etkileri..... | 7 |
| Resim 2.3. ROS'un cilt yaşlanması üzerine etki mekanizması | 11 |
| Resim 2.4. Hidrokinon içeren ürünler..... | 25 |
| Resim 2.5. Arbutin içeren bazı kozmetik ürünler | 27 |
| Resim 2.6. α -Kojik asit içeren bazı kozmetik ürünler | 29 |
| Resim 2.7. Azelaik asit içeren bazı kozmetik ürünler | 30 |
| Resim 2.8. Nanoteknolojik formülasyonlara sahip bazı kozmetik ürünler..... | 36 |
| Resim 4.1. Hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonu..... | 74 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| Simgeler | Açıklamalar |
|--------------------|--|
| °C | Santigrad Derece |
| dk | Dakika |
| g | Gram |
| kg | Kilogram |
| M | Molar |
| mg | Miligram |
| mL | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| nm | Nanometre |
| ppm | Milyonda Bir Birim |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |
| µm | Mikrometre |
| µM | Mikromolar |
| Kısaltmalar | Açıklamalar |
| ADSI | Avusturya İlaç Araştırma Enstitüsü (Austrian Drug Screening Institute) |
| AGE | İleri Glikasyon Ürünleri (Advanced Glycation End Products) |
| AHA | Alfa-Hidroksi Asit |
| AHR | Aril Hidrokarbon Reseptör |
| AP | Aktivatör Protein |
| ASAP | Otomatik Tarama Testi Platformu (Automated Screening Test Platform) |
| ATCC | Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection) |

| | |
|---------------|--|
| BM GHS | Birleşmiş Milletler Küresel Uyumlaştırılmış Kimyasalların Sınıflandırılması ve Etiketlenmesi Sistemi (United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals) |
| cAMP | Siklik Adenozin Monofosfat (Cyclic Adenosine Monophosphate) |
| COX-2 | Siklooksijenaz-2 (Cyclooxygenase-2) |
| CREB | cAMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein (cAMP Response Element-Binding Protein) |
| CUPRAC | Bakır-İndirgeme Antioksidan Gücü (Copper-Reducing Antioxidant Power) |
| DCT | DOPAkrom Tautomeraz (DOPAchrome Tautomerase) |
| DEPT | Polarizasyon Transferi ile Distorsiyonsuz İyileştirme (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) |
| DMSO | Dimetilsülfoksit |
| DPBS | Dulbecco Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (Dulbecco phosphate buffered saline) |
| DPPH | 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil |
| DS | Damlacık Boyutu (Droplet Size) |
| EDTA | Etilendiamin Tetraasetik Asit |
| EGCG | Epigallokateşin Gallat (Epigallocatechin Gallate) |
| EIP | Emülsiyon İncisyon Noktası (Emulsion Inversion Point) |
| ERK | Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz (Extracellular Signal-Regulated Kinase) |
| FALGPA | <i>N</i> -(3-[2-Furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala |
| FRAP | Demir-İndirgeme Antioksidan Gücü (Ferric-Reducing Antioxidant Power) |
| HLB | Hidrofilik Lipofilik Denge (Hydrophilic Lipophilic Balance) |
| LDH | Laktat Dehidrojenaz |
| L-DOPA | L-3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin (L-3,4-Dihydroxy-L-phenylalanine) |
| MAPK | Mitojenle Aktifleşen Protein Kinazlar (Mitogen-Activated Protein Kinases) |

| | |
|--------------|---|
| MART1 | T Hücreleri Tarafından Tanınan Melanomla İlişkili Antijen 1 (Melanoma-Associated Antigen Recognized By T Cells 1) |
| MC1R | Melanokortin 1 Reseptörler (Melanocortyn 1 Receptors) |
| MDA | Malondialdehit |
| MeOH | Metanol |
| MITF | Mikroftalmi ile İlişkili Transkripsiyon Faktörü (Microphthalmia Associated Transcription Factor) |
| MİK | Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu |
| MMP | Matriks Metalloproteinaz (Matrix Metalloproteinase) |
| NADPH | Nikotinamit-Adenin Dinükleotit Fosfat (Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate) |
| NF-κβ | Nükleer Faktör-κB |
| NMN | Nikotinamit Mononükleotit (Nicotinamide Mononucleotide) |
| Nrf2 | Nükleer Faktör E2 ile İlişkili Faktör 2 (Nuclear Factor E2 Associated Factor 2) |
| OPLS | Sıvı Simülasyonları İçin Optimize Edilmiş Potansiyel (Optimised Potential for Liquid Simulations) |
| OTC | Tezgâh üstü (Over the Counter) |
| PDI | Polidispersite indeksi (Polydispersity index) |
| PEG | Polietilen Glikol |
| PIT | Faz İncersiyon Sıcaklığı (Phase Inversion Temperature) |
| PKA | Protein Kinaz A |
| POMC | Pro-opiomelanokortin (Pro-opiomelanocortyn) |
| PRAP | Fosfomolibdenyum-İndirgeme Antioksidan Gücü (Phosphomolybdenum-Reducing Antioxidant Power) |
| RHE | Yeniden Yapılandırılmış İnsan Epidermisi (Reconstructed Human Epidermis) |
| RMSD | Kök Ortalama Kare Sapması (Root Mean Square Deviation) |
| ROS | Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species) |
| RPTP | Reseptör Protein Tirozin Fosfatazlar (Receptor Protein Tyrosine Phosphatases) |
| RTK | Reseptör Tirozin Kinaz (Receptor Tyrosine Kinase) |
| SAPK | Stresle Aktifleşen Protein Kinaz (Stress-Activated Protein Kinase) |

| | |
|--------------------------------|--|
| SCT | Cilt Korozyon Testi (Skin Corrosion Test) |
| SOD | Süperoksit Dismutaz |
| T3 | Triiyodotironin |
| T4 | Tiroksin |
| TCA | Trikloroasetik Asit (Trichloroacetic acid) |
| TNF-α | Tümör Nekrozis Faktör Alfa (Tumor Necrosis Factor Alpha) |
| TRP-1 | Tirozinazla İlişkili Protein-1 (Tyrosinase-Related Protein-1) |
| TSH | Tiroit Uyarıcı Hormon (Thyroid-Stimulating Hormone) |
| TYR | Tirozinaz |
| UV | Ultraviyole |
| WFA | Withaferin A |
| XO | Ksantin Oksidaz (Xanthine Oxidase) |
| YEM | Yüzey Etkin Madde |
| YYEM | Yüzey Etkin Madde + Yardımcı Yüzey Etkin Madde |
| α-MSH | α -Melanosit Uyarıcı Hormon (α -Melanocyte Stimulating Hormone) |

1. GİRİŞ

Kozmetik ürün insan vücudunun dış kısımlarına; epiderma, tırnaklar, kıllar, saçlar, dudaklar ve dış genital organlarına veya dişler ile ağız mukozasına uygulanmak üzere hazırlanmış, tek veya temel amacı bu kısımları temizlemek, koku vermek, görünümünü değiştirmek, bunları korumak, iyi bir durumda tutmak veya vücut kokularını düzeltmek olan bütün madde veya karışımlardır (Kozmetik Yönetmeliği, 2023).

“Kozmesötikler” veya “aktif kozmetikler” olarak adlandırılan ürünler ise, kozmetiklerle ilaçlar arasında geniş bir yelpazede yer almaktadır. Kozmesötikler, deri ve deri eklerinin yapı ve fonksiyonlarını biyofizyolojik etki yoluyla olumlu yönde değiştirmek suretiyle kozmetik etki gösteren preparatlardır. Bunlar klasik kozmetik tanımına tam olarak uymayan, ilaç ve kozmetik arasında tanımlanan preparatlardır (İlaç ↔ Kozmesötik ↔ Kozmetik) (Draelos, 2011). Bir başka tanıma göre; kozmesötikler, hem kozmetik hem de ilaç görevi gören ve kozmetik ürünleri farmasötik ürünlerle birleştiren ürünlerdir.

Deri ve deri eklerine tatbik edilen kozmetiklerin en önemli amacı derinin fizyolojik özelliklerini değiştirmeden güzelleştirmek ve korumaktır. Ancak bu grupta yer almakla birlikte tezgâh üstü (over-the-counter, OTC) olarak kabul edilen bazı kozmetik preparatlar vardır. Bu ürünler farklı hedef noktalarında değişikliklere yol açarak etkilerini gösterirler. Bunlar lipit tabakasını etkileyen ajanlar (antiseboreik ürünler), stratum korneuma etkili ajanlar (nemlendiriciler), deriye renk veren hücreler olan melanositleri hedef alan pigmentojenik (renklendirici) ürünler, ter bezlerini hedef alan antiperspiranlar ve hipodermisi hedef alan zayıflatıcı ve inceltici ajanlar olarak sayılabilirler. Kozmesötiklere örnek olarak ise minoksidil içeren saç losyonları, alfa-hidroksi asit (AHA) içeren kremler ve losyonlar, retinoik asit içeren krem, losyon ve jeller sayılabilir.

Kozmetik endüstrisinde, bilimsel çalışmalarla desteklenmesinden ve dünyada genelde bitkisel veya doğal içerikli ürünlere ve doğal bileşiklere yönelik hızla artan bir tercih trendi gözlenmektedir. Doğal bileşikler benzersiz etkinlikleri, daha düşük toksisiteleri ve çevre dostu doğaları nedeniyle tercih edilmektedir (Yang ve diğerleri, 2020). Bu bileşiklerin daha güvenli olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir ve hem kozmetik markalarının hem de tüketicilerin güvenlik kaygıları açısından önceliğini karşılamaktadır. Ek olarak, pazar

eğilimi, doğal ve sürdürülebilir ürünlere yönelik artan talebe paralel olarak, eko-sertifikalı bitkisel/doğal içeriklere doğru kaymaktadır (Apone ve diğerleri, 2019). Bitki hücre kültüründen türetilmiş aktif kozmetik bileşenlerin kullanımı, son yıllarda endüstriyel ölçekte üretim için standardize edilmiş, kirlenici madde içermeyen ve biyo-sürdürülebilir sistemler sunarak ilgi çekmektedir (Georgiev ve diğerleri, 2018). Üreticiler, çeşitli cilt sorunlarını gidermek ve cilt hastalıklarını tedavi etmek için bitkilerden ve diğer doğal kaynaklardan elde edilen doğal bileşiklere giderek daha fazla odaklanmaktadır ve bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşiklerin tedavi edici potansiyeli sayesinde dermokozmetik/kozmesötik ürünlerde kullanımı artmaktadır (Ahmad ve diğerleri, 2022). Dahası, bitkisel kaynaklı bileşenler içeren yeni kozmetik ürünlerin geliştirilmesi, bitkisel kaynakların etkili bir şekilde kullanılmasına yönelik sürdürülebilir bir yaklaşım olarak ilgi kazanmaktadır (Yano ve diğerleri, 2018). Sonuç olarak, kozmetik ürünlerde bitkilerden elde edilen bileşiklerin tercih edilmesinde bu maddelerin güvenliği, etkinliği, çevre dostu yapısı ve tedavi edici faydaları yatmaktadır. Bitkisel hammaddelerin/bileşiklerin kullanımı, tüketicinin doğal ve sürdürülebilir ürünlere yönelik tercihleriyle uyumlu olup, bu ürünleri kozmetik endüstrisi için değerli bir seçim haline getirmektedir.

Doğal kozmetiklere olan tüketici ilgisi, birçok kişinin kimyasal içerikli ürünlerin potansiyel zararlarından kaçınma eğiliminden kaynaklanmaktadır. Doğal kozmetikler, genellikle bitkisel, mineral ve diğer doğal kaynaklardan elde edilen malzemeler kullanılarak üretilmektedir. Bu ürünlerin doğal olması, kimyasal katkı maddelerinden mümkün olduğunca arındırılmış olmaları ve daha az cilt tahrişi yaratmaları gibi avantajlara sahip oldukları da bilinmektedir. Ayrıca, çevre dostu olmaları ve hayvanlar üzerinde test edilmemiş olmaları gibi etik kaygılar da doğal kozmetiklere olan talebi artırmaktadır. T.C. Ticaret Bakanlığı verilerine göre; Türkiye'deki ekonomik gelişmeye bağlı olarak, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri pazarı her yıl ortalama % 10 büyümektedir. Pazarda doğal kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin payının % 5 civarında olduğu tahmin edilmektedir. Bu durum dünya pazarıyla paralellik göstermektedir. Ancak ülkemizde kozmetik sektörü ağırlıklı olarak, doğal sabunlar, şampuanlar, saç bakım ürünleri, saç boyaları, banyo ve duş ürünleri, ağız bakım ürünleri, ter önleyiciler, traş ürünleri, kolonyalar, tüy dökücüler ile renkli makyaj malzemeleri gibi kozmetikleri üretmekle beraber, özellikle dermokozmetik/kozmesötik kategorisinde yer alan cilt bakım ürünlerine yapılan araştırma-geliştirme (Ar-Ge) yatırımının payı oldukça düşüktür. Ayrıca ülkemizde kozmetik araştırmalarında endüstri-üniversite iş birlikleri de çok sınırlı orandadır.

Türkiye’de kozmetik sektörü ihracatı yıllar içinde artış trendini sürdürmektedir. Söz konusu ihracat, 2021 yılında bir önceki yıla göre % 17 artış göstererek, 1,1 milyar dolar seviyesinde gerçekleşmiştir. Türkiye kozmetik sektörü ihracatında en fazla payı 2021’de % 24 ile tıraş ve deodorant ürünleri ile güzellik/makyaj ürünleri almıştır. Diğer yandan, Türkiye'nin kozmetik madde/ürün ithalatı da 2021 yılında % 8,7 artış göstererek 1,3 milyar dolar seviyesine ulaşmıştır. 2021 yılında en fazla ithalat, sanayide kullanılan koku verici maddeler ve karışımlarda gerçekleştirilirken, bu ürün grubunu güzellik, makyaj ve cilt bakımı için müstahzarlar ve parfümler takip etmiştir. Geçen yıl kozmetik ürünleri ithalatında en fazla payı alan ülkeler sırayla % 18,3 ile Fransa, % 14 Almanya ve % 10,4 ile İrlanda almıştır.

Ülkemizin ithalat rakamları, kozmetik ürünlerde halen büyük ölçüde yurtdışına bağımlı olduğumuza işaret etmektedir. Bu nedenle, dışa bağımlılığı azaltmak ve milli ekonomiye katkıda bulunmak için ülkemizde kaliteli kozmetik hammaddesi ve bitmiş kozmetik ürün üretilmesi ve bu alanda Ar-Ge kabiliyetimizin, yatırımlarımızın ve üniversite-endüstri iş birliklerinin artırılması gerekmektedir.

Diğer yandan dünyada, özellikle Ortadoğu, Uzakdoğu ve Afrika ülkelerinde kadın tüketiciler tarafından cilt rengini açıcı kozmetik ürün pazarına hızla artan bir talep gözlenmektedir. Avrupa ülkelerindeki kadın tüketicilerin ise yaşlanma karşıtı (anti-aging), kırışıklık giderici (anti-wrinkle) ve güneş koruyucu kozmetik ürünlere rağbet gösterdiği bilinmektedir. Buna göre, multifonksiyonel kozmetik ürünlere tüketici daha fazla ilgi göstermektedir.

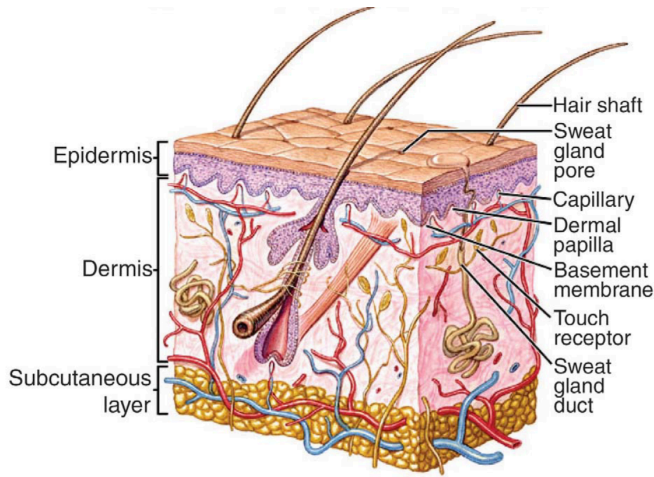
“Bitkisel Kökenli Bazı Fenolik Bileşiklerin *In Vitro* ve *In Silico* Deney Modelleri ile Cilt Lekesi Giderici Etkilerinin İncelenmesi ve Kozmetik Formülasyon Tasarlanması” başlıklı tezimizde, bitkilerde yaygın bulunduğu bilinen fenolik bileşiklerin farklı kimyasal gruplarından 36 adet bileşik seçilmiş, cilt lekelerini açıcı ve kırışıklık karşıtı etkileri tirozinaz (tyrosinase, TYR), elastaz, kolajenaz ve ksantin oksidaza (xanthine oxidase, XO) karşı enzim inhibisyonu deneyleri ile *in vitro* olarak tayin edilmiştir. Fenolik bileşikler, 3 ayrı yöntem ile antioksidan aktiviteleri açısından da test edilmiştir. TYR’ı etkili şekilde inhibe ettiği belirlenen fenolik bileşikler *in silico* ortamda moleküler kenetlenme deneylerine tabi tutulmuştur. Bu bileşiklerin sitotoksisiteleri, SKMEL-3 insan malignant melanoma hücre hattında tespit edilmiştir. Ön taramamızda TYR’ın aktif inhibitörü olduğunu belirlediğimiz bileşikler seçilerek, ikili ve üçlü kombinasyonları hazırlanmış ve tekrar TYR’a karşı test edilmiştir. İnhibitör etki açısından en uygun kombinasyon olduğuna karar verilen fisetin:

kersetin (1:1) kombinasyonu içeren nanoemüljel formülasyonu hazırlanmıştır. Nanoemüljel formülasyonumuz, Avusturya İlaç Araştırma Enstitüsünde (Austrian Drug Screening Institute, ADSI) bulunan kozmetik laboratuvarında iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) deneysel modeller ile test edilmiştir. 2D modelleri ile HaCaT keratinosit hücrelerinde hücre canlılığına etkisi ile lusiferaz yöntemi ile NF- κ B indüksiyonu üzerinden anti-enflamatuvar etkisi incelenen nanoemüljel formülasyonunun cilt üzerine korozyon etkisi 3D cilt modelleri ile yeniden yapılandırılmış insan epidermis hücreleri üzerinde EpiCS[®] yöntemi ile incelenmiştir. İlaveten nanoemüljel formülasyonunun cilt rejenerasyonu üzerine etkisi; anti-enflamatuvar etkinlik açısından çeşitli sitokinler ve kemokinlere karşı xMAP Luminex teknolojisi ile incelenmiştir. Nanoemüljel formülasyonumuz üzerinde kısa süreli (3 ay) stabilite çalışması da gerçekleştirilmiştir. Formülasyon için ulusal patent başvurusu da yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı

Deri “epidermis, dermis ve hipodermis” olmak üzere 3 ana katmandan oluşan kompleks bir organdır. Epidermis derinin en dış tabakası olup, patojenler, UV radyasyonu ve kimyasallar gibi çevresel faktörlere karşı bariyer görevi görür. Öncelikle cilde güç ve su geçirmezlik sağlayan protein olan keratini üreten keratinositlerden oluşur. Epidermis ayrıca cilt renginden ve UV hasarına karşı korumadan sorumlu pigment olan melanin üreten melanositleri de içerir. Ayrıca epidermisteki Langerhans hücreleri bağışıklık sisteminin bir parçasıdır ve enfeksiyonlara karşı korunmaya yardımcı olur (Proksch ve diğerleri, 2008).



Resim 2.1. Derinin katmanları (MacNeil, 2008)

Cilt yenilenmesinin (rejenerasyon) gerçekleştiği, kan damarlarının bulunmadığı bakterilere karşı temel koruyucu özellik gösteren en dıştaki epidermis tabakası; aşağıdaki tabakalardan oluşmaktadır (Resim 2.1):

- *Stratum corneum*: Epidermisin en dış katmanı olan stratum corneum, “korneosit” adı verilen ölü keratinositlerden oluşur. Bu hücreler, patojenler ve UV radyasyonu gibi dış etkenlere karşı koruyucu bir bariyer oluşturan lipitlerle çevrilidir.
- *Stratum lucidum*: Yalnızca avuç içi ve ayak tabanı gibi kalın deride bulunan stratum lucidum, ölü keratinositlerden oluşan ince, yarı saydam bir tabakadır. Bu katman cilde ek koruma ve destek sağlamaktadır.

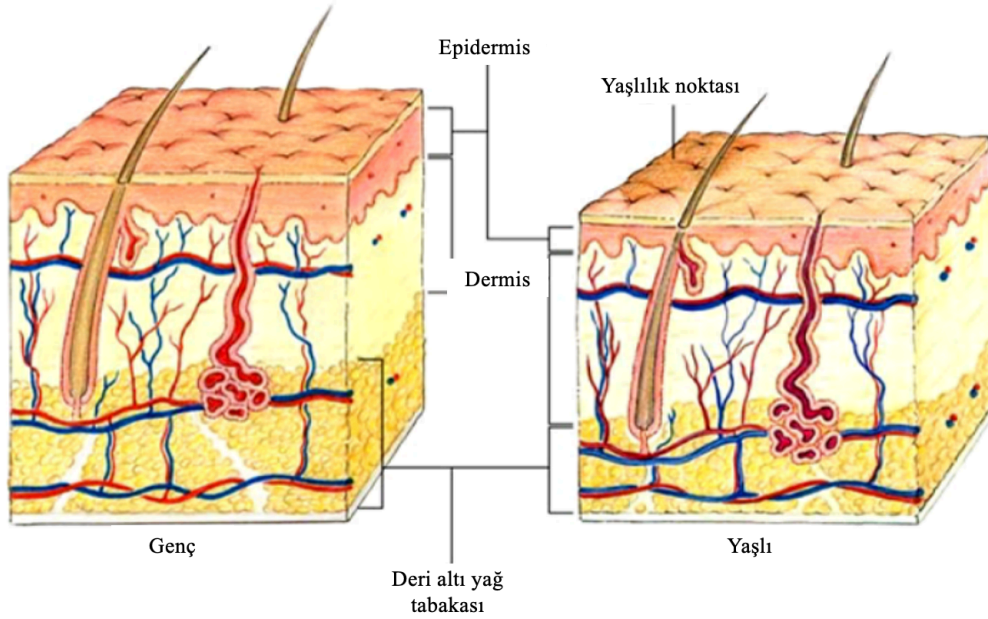
- *Stratum granulosum*: Keratinositlerin programlanmış bir hücre ölümü süreci olan apoptoza uğramaya başladığı katmandır. Bu katman aynı zamanda cildin bariyer fonksiyonuna katkıda bulunan lipitlerin üretiminde de rol oynamaktadır.
- *Stratum spinosum*: “Dikenli hücre tabakası” olarak da bilinen stratum spinosum, birkaç canlı keratinosit tabakasından oluşur. Bu hücreler, cilde güç ve esneklik sağlayan desmozomlarla birbirine bağlanır. Stratum spinosum’da bakterileri fagosite eden Langerhans hücreleri de bulunur (Baroni ve diğerleri, 2012).
- *Stratum bazale (Stratum germinativum)*: Epiderminin en derin tabakası olan stratum bazale, sürekli bölünerek yeni keratinositler oluşturan bazal hücrelerden oluşur. Bu katman aynı zamanda cilt rengini ve UV korumasını sağlayan melanin pigmentini üretmekten sorumlu melanositleri de içermektedir.

Epiderminin altında kan damarları, sinirler, kıl folikülleri ve ter bezleri gibi temel yapıları içeren dermis bulunur. Dermis, kolajen ve elastik lifler gibi hücre dışı matris bileşenleri açısından zengindir ve cildin fiziksel özelliklerine, özellikle de elastikiyetine önemli ölçüde katkıda bulunur. Dermisteki sinir uçları dokunma, basınç, ağrı ve sıcaklık gibi duylardan sorumludur.

Hipodermis veya deri altı dokusu esas olarak yağ ve bağ dokusundan oluşur ve vücut için yalıtım ve dolgu sağlar. Hipodermis ayrıca cildi ve alttaki dokuları besleyen daha büyük kan damarlarını ve sinirleri içermektedir.

Sonuç olarak; derinin 3 katmanı, vücudu dış tehditlerden korumak, sıcaklığı düzenlemek, duyu bilgisi sağlamak ve genel vücut fonksiyonlarını desteklemek için birlikte çalışır. Ayrıca cildimiz, güneş ışığına maruz kaldığında D vitamini sentezlemek için hayati öneme sahiptir (Zegour ve diğerleri, 2018). Cildin yapısını incelemek sadece onun fonksiyonlarını kavramamızı geliştirmekle kalmaz, aynı zamanda yapısı bozulduğunda ortaya çıkabilecek potansiyel cilt rahatsızlıkları ve hastalıkları hakkında da fikir vermektedir. Cilt geçirgenliği modelleri ve cilt yaşlanması üzerine, çeşitli bilimsel disiplinlerde yapılan araştırmalar, cildin yapısını anlamının önemini daha da vurgulamaktadır (Tsakovska ve diğerleri, 2017; Flynn ve McCormack, 2008).

2.2. Cilt ve Yaşlanma Süreci



Resim 2.2. Cilt yapısında yaşlanma etkileri (Farage ve diğerleri, 2007)

Cildimizin yaşlanma sürecine çeşitli faktörler etki etmektedir. Öncelikle güneş ışınlarına (özellikle UV ışınları) maruz kalmak, cildin yaşlanmasında önemli bir rol oynar. Güneşe maruz kalma ciltte kırışıklıklar, lekeler ve sarkmalar gibi belirtilere ve fotoyaşlanmaya neden olur (Arslan, 2022). Ayrıca, hormonal değişiklikler de cildin yaşlanmasında etkilidir. Özellikle menopoz döneminde östrojen seviyelerindeki azalma sonucunda, ciltte incelmeye, kırışıklıkların artması ve elastikiyet kaybı gibi belirtiler ortaya çıkmaktadır (Bekmezci & Altuntuğ, 2020). Cilt yaşlanması ayrıca genetik faktörler, çevresel etkenler ve yaşam tarzı alışkanlıkları gibi çeşitli faktörlerden de etkilenebilir. Bu süreç, cildin doğal olarak zamanla azalan kolajen ve elastin üretimi ile de ilişkilidir. Kolajen ve elastin liflerinin azalması, cildin sıkılığını ve esnekliğini kaybetmesine ve kırışıklıkların oluşmasına neden olur (Baumann, 2007). Sonuç olarak, cildimiz yaşlanma sürecine çeşitli iç ve dış faktörler nedeniyle maruz kalmaktadır. Resim 2.2.'de de görüldüğü üzere güneş ışınları, hormonal değişiklikler, genetik faktörler ve yaşam tarzı alışkanlıkları gibi etkenler cildin yaşlanmasında rol oynar ve ciltte kırışıklıklar, lekeler ve sarkmalar gibi belirtilere yol açabilir.

Yukarıda da belirtildiği gibi, cilt yaşlanması içsel ve dışsal faktörlerden etkilenen çok yönlü bir süreçtir. İçsel mekanizmalar arasında oksidatif stres, DNA hasarı, telomer kısalması, hormonal değişiklikler ve otofaji bozukluğu yer alır. Menopoz sonrası östrojen eksikliği

cildin yaşlanmasını hızlandırırken, dermal kolajen kaybı ve parçalanması cildin ince ve zayıf olmasına neden olur. Glikasyon, ileri glikasyon son ürünlerinin (advanced glycation end products, AGE) birikmesine yol açarak kırışıklıklara ve elastikiyet kaybına neden olur. UV radyasyonu, sigara ve kirleticiler gibi dış faktörler de erken cilt yaşlanmasında önemli bir rol oynar. UV radyasyonuna maruz kalma, cilt yaşlanmasının birincil nedenidir ve yaşlı ciltte azalan kolajen üretimi, fibroblast yaşlanması ve azalan mekanik uyarıyla bağlantılıdır. Cilt yaşlanması sonuç olarak daha ince, daha sert ve daha az esnek bir cilde neden olur. Antioksidanlar, cildin yaşlanmaya karşı korunmasındaki rolleri nedeniyle incelenmiştir. Antioksidanlar, cilt yaşlanmasının merkezi yönleri olan reaktif oksijen türleri ve MMP'ler ile savaşırlar. Cilt anjiyogenezindeki yaşlanmaya bağlı değişikliklerin moleküler mekanizmalarının anlaşılması, cilt yaşlanmasının önlenmesine yönelik bilgiler sunmaktadır (Kohl ve diğerleri, 2011). Antioksidanlar oksidatif stresi azaltabilir ve kirlilik gibi çevresel faktörlerin neden olduğu cilt yaşlanmasına karşı koruma sağlarlar (Chung ve Eun, 2007). Antioksidanların karışımlardaki sinerjistik ve antagonistik etkileri, etkileşimlerine ve kimyasal yapılarına bağlıdır (Lanuti ve Kirsner, 2010). Antioksidanların lipit oksidasyonunu ve hidrolizini önleyerek oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (Maillard ve diğerleri, 2003). Antioksidanlar, oksidatif stres ve cilt yaşlanmasıyla ilişkili diğer mekanizmalarla mücadele ederek cildin yaşlanmaya karşı korunmasında çok önemli bir rol oynar. Cilt hücreleri, hücre solunum, metabolik süreçler veya dış saldırılar altında sürekli olarak genellikle "serbest radikaller" olarak adlandırılan yüksek derecede reaktif moleküller oksidasyon ürünleri üretir (Addor, 2017).

Cilt yaşlanması 2 sınıfta incelenebilir;

İçsel yaşlanma; genellikle cildin güneşten korunan bölgelerinde olur.

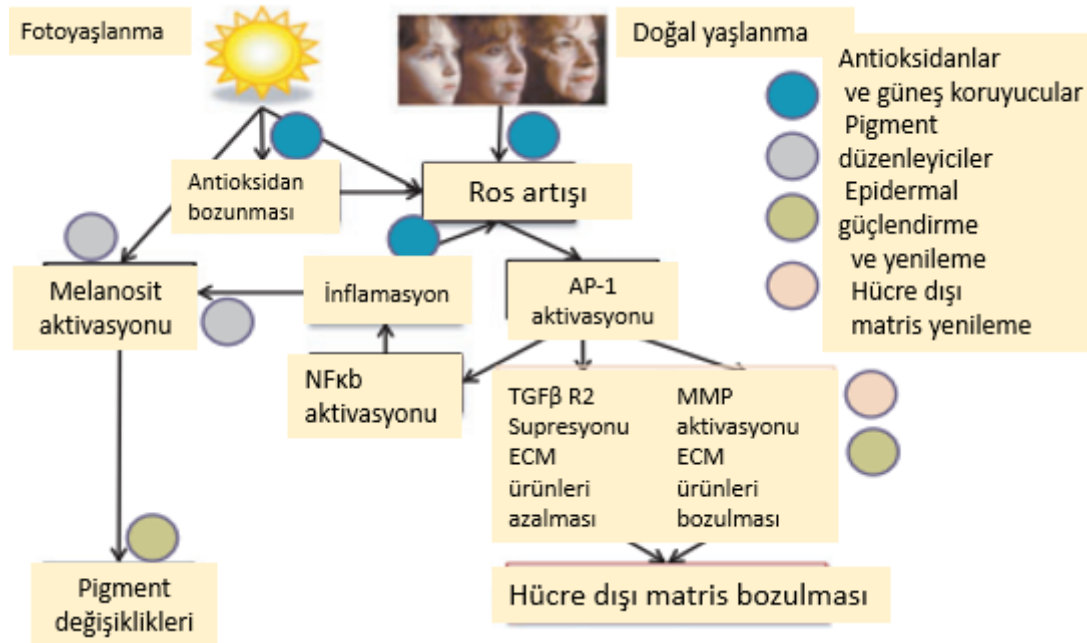
Her iki yaşlanma tipi de moleküler mekanizma olarak benzerdir. İçsel cilt yaşlanmasına ilişkin çeşitli teorilerde aşağıdaki hususlar önemlidir:

- Hücre yaşlanma (Hayflick-Limit) ve telomerlerin kısalması mitokondriyal DNA mutasyonları, oksidatif stres, genetik mutasyonlar ve çeşitli hormon düzeylerinde azalma.
- Yaşlanmanın serbest radikal teorisine göre, reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species, ROS) önemli rol oynar.

- ROS'un hücrenel bileşenlere çok fazla zarar vermesi sonucu, antioksidatif kapasitenin azalmasına ve son olarak hücrenel yaşlanmaya yol açar.

ROS cilt yaşlanmasına yönelik etkisini, mitojenle aktifleşen protein kinazlar (mitogen-activated protein kinases, MAPK) yoluyla transkripsiyon faktörü c-Jun'u indükleyerek gösterir. Bu indüksiyon, belirleyici transkripsiyon faktörü aktivatör protein (AP)-1'i aktive eder, "interstisyel kolajenaz" olarak da bilinen matris metalloproteinaz-1 (matrix metalloproteinase, MMP), MMP-3 (stromelisin 1) ve MMP-9'un (jelatinaz b) ekspresyonuna yol açar ve prokolajenin ekspresyonunu önler. Prokolajenin bu sonuçlarına uygun olarak, fotoyaşlanmış cilde benzer şekilde, kronik süreçte yaşlanmış ciltte yüksek seviyelerde parçalanmış kolajen mevcuttur.

İçsel yaşlanma ise genellikle hormonal değişikliklerden etkilenir. Menopozla birlikte östrojen ve progesteron dengesi bozulur. Özellikle östrojen ve androjen eksikliği; kuruluk, kırışıklık, epidermal atrofi, kolajen parçalanması ve elastikiyet kaybına neden olur (Kohl ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.1. İçsel ve dışsal yaşlanmanın biyokimyasal yolağı (Makino, 2012)

Dışsal yaşlanma; içsel yaşlanmanın üzerine UV etkilerinin eklenmesiyle olur. UV radyasyonuna maruziyet, dışsal cilt yaşlanmasının birincil faktörüdür ve yüz yaşlanmasının yaklaşık % 80'ini oluşturur. Doğal olarak yaşlanmış ciltteki ince epidermisin aksine, UV ışınlarına maruz kalan epidermis çok kalınlaşır. Epidermisin en dış tabakası olan stratum corneum en çok etkilenir ve korneosit desmozomlarının parçalanamaması nedeniyle kalınlaşır. Stratum corneumda, bir protein komponenti olan involukrinin ekspresyonu artar ve bu da epidermal keratinositlerin farklılaşma sürecinin UV ışınlanması nedeniyle bozulduğu gerçeğiyle uyumlu bir süreçtir. Epidermal kök hücre belirteçlerinden biri olan β 1-integrin ekspresyonunun büyük ölçüde azalması, yaşlı bazal keratinositlerdeki çoğalmanın da bozulduğunu göstermektedir (Şekil 2.1.).

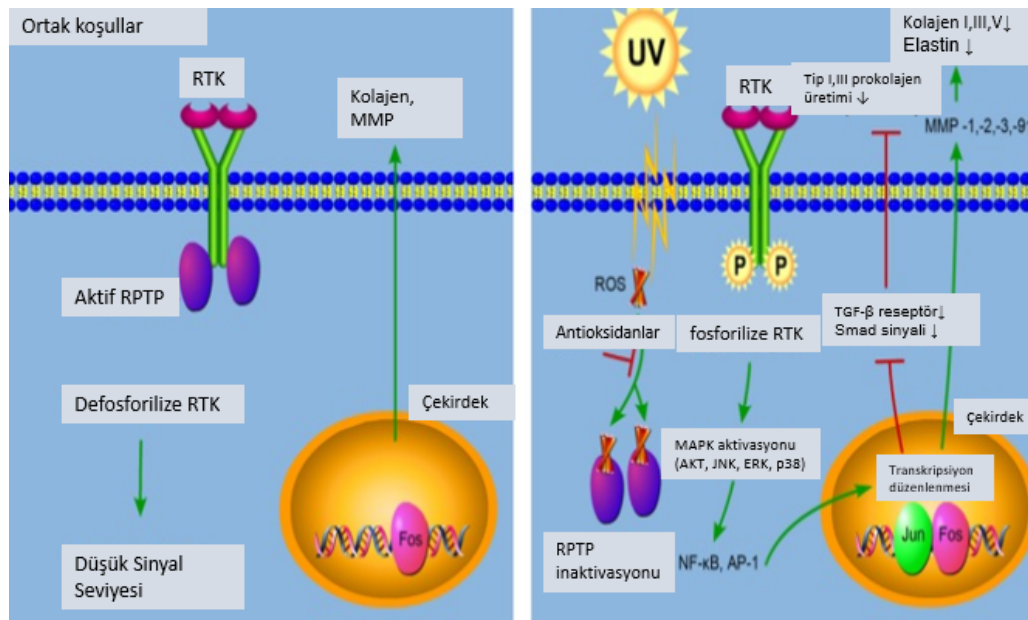
Cilt yaşlanması, ultraviyole (UV) A, UVB ve UVC dahil olmak üzere çeşitli radyasyon türlerinden etkilenir. En uzun dalga boyuna sahip olan UVA, derinin derinliklerine nüfuz edebilir, dermis tabakasına zarar verebilir ve kırışıklıklara ve düzensiz pigmentasyona neden olarak cildin yaşlanmasına neden olabilir (Han ve diğerleri, 2016; Gilbert ve diğerleri, 2023). Esas olarak epidermisi etkileyen UVB'ye kronik maruz kalma, kırılganlık, gevşeklik, pürüzlülük, kuruluk, hiperpigmentasyon ve kırışıklık oluşumu ile karakterize cilt yaşlanmasına yol açar (Lee ve diğerleri, 2023). UVC radyasyonu çoğunlukla atmosfer tarafından engellenir ve cilt yaşlanması açısından önemli bir sorun oluşturmaz (Kim ve diğerleri, 2013). UV radyasyonu, özellikle UVA, oksidatif stres, iltihaplanma ve hücre dışı matriste hasar gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla cilt yaşlanmasına neden olabilir (Yim ve diğerleri, 2019; Yoshihisa ve diğerleri, 2014). Hem akut hem de kronik UV radyasyonuna maruz kalma, güneş yanığı, pigmentasyon, iltihaplanma, fotoyaşlanma ve cilt kanseri gibi cilt sorunlarıyla ilişkilidir. UV radyasyonuna maruz kalma ayrıca bağışıklık sisteminin baskılanmasına, erken cilt yaşlanmasına, iltihaplanmaya ve hücre ölümüne yol açabilir. Antioksidanlar, UV kaynaklı cilt hasarına ve yaşlanmaya karşı koruyucu etkileri açısından incelenmiştir. Örneğin, β -nikotinamid mononükleotit (β -nicotinamide mononucleotide, NMN), farelerde UVB'nin neden olduğu cilt hasarına karşı koruma göstermiştir (Ma ve diğerleri, 2020).

Keratinositlerdeki tip VII kolajenin ekspresyonu, UV ışınlarına maruz kalan cilt bölgelerinde azalmaktadır. Tip VII kolajenler, dermal-epidermal kavşaktaki sabitleme fibrilleridir. Tip VII kolajenlerin üretimindeki azalma, dermis ve epidermis arasındaki bağlantının zayıflaması nedeniyle kırışıklıklara sebep olur. Fotoyaşlanmış ciltte “solar elastoza” adı

verilen dermisin derinliklerinde anormal elastik doku birikmesi görülür. UV ışınımı, elastinin ekspresyonunu 4 kat artırır, daha sonra proteazlar tarafından elastik lif bölünmesiyle karakterize edilen ve kesik elastik liflerin ciddi şekilde birikmesiyle sonuçlanan elastoliz meydana gelir. MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-12, nötrofil serin proteazlar katepsin G ve insan lökosit elastazının elastini parçaladığı bilinmektedir. Fotoyaşlanmanın sonucu olarak, tropoelastin moleküllerinin *N*-terminali ve merkezi kısımları enzimatik bölünmeye karşı daha duyarlı hale gelir ve dolayısıyla elastin-4'ün yaşa bağlı bozulması hızlanır (Zhang ve Duan, 2018).

2.2.1. Oksidatif stres

ROS, hem içsel yaşlanmanın hem de dışsal yaşlanmanın dermal hücre dışı matris değişikliklerinde kritik bir rol oynadığı kabul edilmektedir. ROS; mitokondriyal elektron taşıma zinciri, peroksizomal ve endoplazmik retikulum lokalize proteinleri, Fenton reaksiyonu ve siklooksijenazlar (cyclooxygenase, COX), lipoksijenazlar (lipoxygenase, LOX), XO'lar ve nikotinamit-adenin dinükleotit fosfat (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADPH) oksidazlar gibi enzimler dahil olmak üzere farklı kaynaklardan üretilir.



Resim 2.3. ROS'un cilt yaşlanması üzerine etki mekanizması (Zhang ve Duan, 2018)

Hücre yüzeyindeki reseptör tirozin kinazların (receptor tyrosine kinase, RTK) aktivitesi, RTK'ları fosforile eden reseptör protein tirozin fosfatazlar (receptor protein tyrosine phosphatase, RPTP) tarafından inhibe edilir (Resim 2.3). Bununla birlikte, UV radyasyonu altında hücrel kromoforlar enerjiyi emer ve uyarılır, oksidasyon ürünleri ve ROS üretilir. ROS, RPTP'ların katalitik bölgelerindeki sisteine bağlanarak RPTP'lerin aktivitesini inhibe eder, fosforile edilmiş RTK'ların seviyesini yükseltir ve mitojenle aktive olan protein kinazların (mitogen-activated protein kinases, MAPK) ve ardından gelen nükleer faktör- κ B'nin (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) aktivasyonunu ve transkripsiyon faktörü AP-1 dahil olmak üzere sinyal yollarını tetikler. Aktive edilmiş NF- κ B ve AP-1 ise kolajen üretimini baskılar ve MMP gen transkripsiyonunu arttırır. Bu da fotoyaşlanmış ciltte kolajen içeriğinin azalmasına neden olur. Cilt hücreleri, hücrel solunum, metabolik süreçler veya dış saldırılar altında sürekli olarak genellikle “serbest radikaller” olarak adlandırılan yüksek derecede reaktif moleküller, oksidasyon ürünleri üretir (Addor, 2017).

2.3. Hiperpigmentasyon

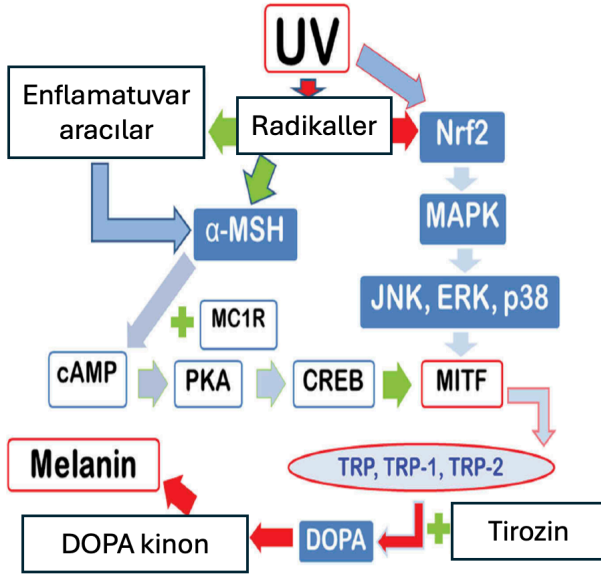
Hiperpigmentasyon, melanositlerin sayısı ve yoğunluğundaki artış veya deriye renk veren diğer seçenekler sonucu ortaya çıkar. Hiperpigmentasyon, aşırı melanin üretimi nedeniyle cildin belirli bölgelerinin koyulaşmasıyla karakterize, yaygın bir cilt rahatsızlığıdır. Hiperpigmentasyon epidermis, dermis veya her iki alanda melanin miktarındaki artışı tanımlamak için kullanılan bir terimdir (Cüre, 2016).

Melanositler, cilde ve saçta renk veren pigment olan melanin üretiminden sorumlu özel hücrelerdir. Bu hücreler, UV ışınlarını emerek ve dağıtarak, cildin UV radyasyonun zararlı etkilerinden korunmasında çok önemli bir rol oynar. Melanositler öncelikle derinin epidermisinde ve kıl foliküllerinde bulunur (Cichorek ve diğerleri, 2013). Melanositler tarafından melanin üretimini içeren melanogenez süreci, cilt ve saç renginin belirlenmesi için gereklidir. Çalışmalar, melanositlerin embriyonik gelişim sırasında nöral kret hücrelerinden türetildiğini ve cilt pigmentasyonu için çok önemli olduğunu göstermiştir (Mizoguchi, 2004). Melanositler ayrıca melanosit kaybının ciltte depigmente lekelere yol açtığı vitiligo gibi çeşitli cilt bozukluklarında da rol oynar (Lee ve Fisher, 2014). Ek olarak melanositler, melanositlerden kaynaklanan ve genetik mutasyonlar ve UV'ye maruz kalma ile ilişkili bir tür cilt kanseri olan melanomada da rol oynar (Bertrand ve diğerleri, 2020).

UV ışınlarına maruz kalma, hormonal değişiklikler, iltihaplanma ve ilaç kullanımı dahil olmak üzere çeşitli faktörler hiperpigmentasyona neden olur. Araştırmalar, UV ışığa maruz kalmanın, melanositleri aktive ederek ve melanin üretimini artırarak hiperpigmentasyonu tetikleyebileceğini göstermiştir (Gilchrest ve diğerleri, 1996). Ek olarak, hamilelik sırasındaki hormonal değişiklikler, hamilelikle ilişkili kutanöz hiperpigmentasyona yol açabilir ve bu da hormonal dalgalanmaların cilt pigmentasyonundaki rolünü vurgular (Fernandez-Flores ve diğerleri, 2018). Ayrıca dioksinler gibi tehlikeli aril hidrokarbon reseptör (AHR) ligantlarına maruz kalma, klorakne ve hiperpigmentasyonla ilişkilendirilmiştir (Furue ve Tsuji, 2019). AHR ile melanogenez ve hiperpigmentasyonun düzenlenmesindeki rolü de önemlidir (Luecke ve diğerleri, 2010). AHR yolunun aktivasyonunun benzantron kaynaklı hiperpigmentasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Abbas ve diğerleri, 2017). Enflamatuvar araçlar ve doku hasarı, melanositleri uyarabilir ve yaranın hiperpigmentasyonuna yol açabilir (Park ve diğerleri, 2021; Lévesque ve diğerleri, 2012). Partikül maddeler cilt hiperpigmentasyonu ile ilişkilendirilmiştir ve bu durum çevresel faktörlerin cilt pigmentasyonu üzerindeki etkisini vurgulamaktadır (Yang ve diğerleri, 2022). Ek olarak COX-2 gibi spesifik moleküler yolakların hedeflenmesinin melanogenez baskılama ve hiperpigmentasyon bozukluklarını tedavi etme potansiyeli olduğu gösterilmiştir (Kim ve diğerleri, 2012). Genel olarak hiperpigmentasyon, çeşitli iç ve dış faktörlerden etkilenen çok faktörlü bir durumdur.

2.3.1. Melanogenez

Melanogenez; membrana bağlı “melanozom” adı verilen organellerdeki melanin pigmentinin sentezlenme sürecidir. Cildin hiperpigmentasyonu sırasında radikal ve enflamasyon gibi çeşitli faktörler etkilidir. UV radyasyonu, keratinositleri küçük bir peptid hormonu olan pro-opiomelanokortinden (pro-opiomelanocortyn, POMC) türetilen α -melanosit uyarıcı hormonu (α -melanocyte-stimulating hormone, α -MSH) salgılamaları için uyarır. α -MSH, melanokortin 1 reseptörlerini (melanocortin-1 receptor, MC1R) uyararak melanositlere bağlanır. Sonucunda çoklu sinyal yoluyla siklik adenozin monofosfat (cyclic adenosine monophosphate, cAMP), protein kinaz A (protein kinase A, PKA), cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (cAMP response element-binding, CREB) ve mikroftalmi ile ilişkili transkripsiyon faktörü (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) aktivitesi ile melanogenez tetiklenir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Melanogenez mekanizması (Kanlayavattanakul ve Lourith, 2017)

MITF, melanojenik enzimlerin TYR, TYR'la ilişkili protein-1 (tyrosinase-related protein-1, TRP-1) ve TYR'la ilişkili protein-2 (tyrosinase-related protein-2, TRP-2) gibi transkripsiyonu düzenleyen anahtar bir transkripsiyon faktörüdür.

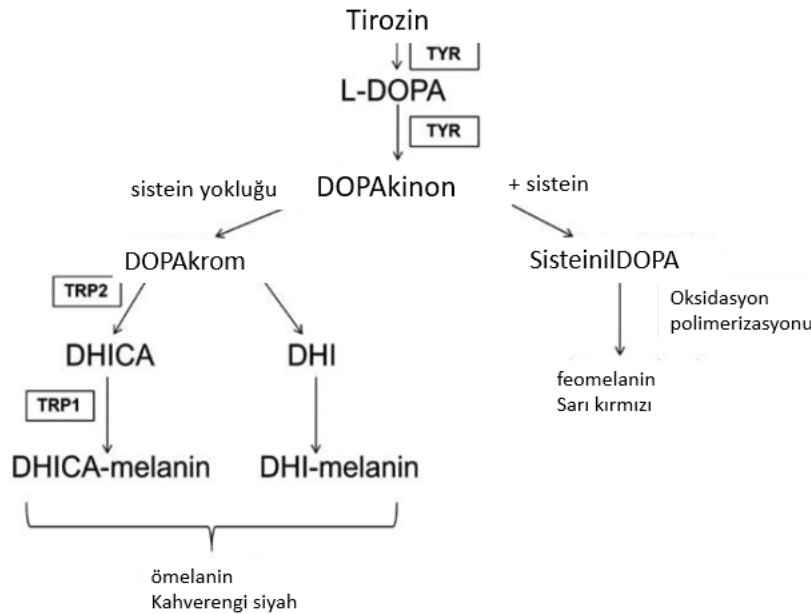
MAPK, stresle aktifleşen protein kinazlar (stress-activated protein kinases, SAPK)/cJun NH2-terminal kinazlar (JNK), p38 ve hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (extracellular signal-regulated kinases, ERK) olmak üzere, 3 alt tipten oluşur. JNK ve p38 kinazlar pro-enflamatuvar sitokinler tarafından ve çevresel olarak UV ışınlarına maruz kalma ile ısı gibi stres etmenleri tarafından uyarılır.

Melanogenez MAPK'lar tarafından kontrol edilir ve MITF p38 fosforilasyonu ile aktive edilir. Buna karşılık ERK aktivasyonu MITF aktivitesini azaltarak melanin sentezini inhibe eder. Böylece ERK sinyal yolunun baskılanması hücre farklılaşması ve tirozinaz aktivitesinin düzenlenmesi sonucu melanogenezi uyarır. Ayrıca MAPK sinyali yolu, nükleer faktör E2 ile ilişkili faktör 2'yi (Nrf2) modüle eder. Nrf2 cilt hücrelerini, UV radyasyonu gibi oksidatif strese karşı korumak için antioksidan tepkiyi kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. (Kanlayavattanakul ve Lourith, 2017)

Melanozomlar, feomelanin ve iki tür ömelanin olmak üzere 3 çeşit melanin üretir. Feomelanin kırmızıdan sarıya kadar olan tonlarda olup, kızıl saçlardan ve çillerden

sorumludur. Melaninin en bol bulunan formu ömelanin yüksek oranda koyu kahverengiden siyaha kadar renklere sebep olur. Ömelanin antioksidan özelliklere sahipken, feomelanin fototoksik prooksidan etki sergiler. Melanin sentezi için TYR, TRP1 ve “DOPAkrom tautomeraz” (DOPAchrome tautomeraz, DCT) olarak da bilinen TRP2 olmak üzere bir dizi spesifik enzim gereklidir. Memelilerde ömelanin birikimi için gerekli olan ve melanozomlarda ipliksi bir formda bulunan önemli bir yapısal melanosit proteini olarak bilinen Pmel17 (gp100) ve T hücreleri tarafından tanınan melanoma antijeni (melanoma antigen recognized by T cells, MART1) bulunur.

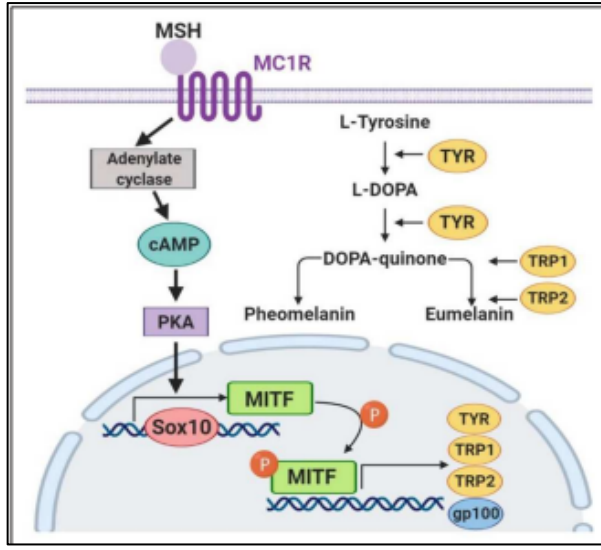
Tüm melanin türleri için ortak olan ilk adım; tirozinin hidrosilasyonu ve 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) ve L-DOPA'nın DOPAkina oksidasyonu şeklindedir. İki de melanin biyosentetik yolağı için önemli bir enzim olan TYR tarafından katalize edilir. Substratların uygunluğu ve melanogenetik enzimlerin yapısı hangi tür melanin üretileceğine karar verir. Sistein varlığında 3- veya 5-sisteinil DOPA oluşur ve sarı-kırmızı feomelanin üretilir.



Şekil 2.3. Melanogenez sırasında melanositlerden melanin sentezi (Cichorek ve diğerleri, 2012)

Sistein yokluğunda DOPAkina kendiliğinden enzimatik olmayan reaksiyonlar ile DOPAkroma dönüşür ve bu süreç çok hızlı ilerler (Şekil 2.3). DOPAkrom enzimatik olmayan ve enzimatik olan TRP'ler-aracılı yolak ile ömelanini verir. İlk durumda

DOPAkrom kendiliğinden dekarboksilasyona uğrayarak, 5,6-dihidroksiindol (dihydroxyindol, DHI) haline gelir, hızla oksitlenip polimerize olup kahverengi/siyah koyu renk oluşumuna sebep olan DHI-melanin oluşturur. İkinci yolda TRP2, DHI2-karboksilik asit (DHICA) oluşturmak üzere DOPAkromu tautomerize eder. Daha sonra TRP1 DHICA oksidasyonu ve polimerizasyonunu katalize eder ve sonucunda DHICA-melanin oluşur. (Cichorek ve diğerleri, 2012)



Şekil 2.4. Melanogenez sinyal yoluğu (Zurina ve diğerleri, 2020)

2.3.2. Hiperpigmentasyon Tedavisi

Yaygın bir dermatolojik sorun olan hiperpigmentasyon, çeşitli tedavi yöntemleriyle etkili bir şekilde yönetilebilir. Hiperpigmentasyonun tedavisi topikal ajanlar, lazer tedavileri, doğal ekstratler ve yenilikçi prosedürleri içeren çok çeşitli tedavi yöntemlerini kapsar.

Hiperpigmentasyon tedavisi ilk olarak, traneksamik asit ve melatonin gibi oral terapötik ajanlarla tamamlanan hidrokinon, kojik asit ve glikolik asit gibi ajanlar içeren topikal formülasyonların kullanımını kapsar (Nautiyal ve Wairkar, 2021). İlaçlar ve metalik tuzların neden olduğu hiperpigmentasyonu gidermek için, özellikle Q-switched (QS) lazerler kullanılmak suretiyle, lazer tedavileri önerilmektedir (Passeron ve diğerleri, 2019). Pikosaniye lazerler de dahil olmak üzere lazerler, çeşitli hiperpigmentasyon durumlarının tedavisinde umut verici sonuçlar sunan etkili araçlar olarak ortaya çıkmıştır (Vachiramom ve diğerleri, 2022; Vachiramom ve diğerleri, 2021). Ek olarak kimyasal soyma (peeling), yoğun

atımlı ışık terapisi ve trombosit açısından zengin plazma enjeksiyonları gibi tedaviler, melazma gibi durumlar da dahil olmak üzere hiperpigmentasyonun tedavisinde umut vaat etmektedir (Sirithanabadeekul ve diğerleri, 2019; Li ve diğerleri, 2023). Ayrıca, bitkisel ekstraktlar ve *Aloe vera* jeli gibi uygulamalar, hiperpigmentasyona yönelik potansiyel doğal seçenekler sunmaktadır. (Zhu ve Gao, 2008; Chiu ve diğerleri, 2023). Ayrıca mikofenolat mofetil ve azelaik asit gibi bileşiklerin, sırasıyla edinilmiş dermal maküler hiperpigmentasyonu ve iltihap sonrası hiperpigmentasyonu azaltıcı etkisi bulunmuştur (Albahloul ve diğerleri, 2021; Bishnoi ve diğerleri, 2021). Adipoz kök hücrelerle zenginleştirilmiş yağ greftleri ve uzun dalga plazma radyofrekans ablasyonu gibi yeni yaklaşımlar da hiperpigmentasyonun iyileştirilmesinde potansiyel göstererek bu dermatolojik soruna yenilikçi çözümler sunmaktadır (Bashir ve diğerleri, 2023; Baroni, 2018).

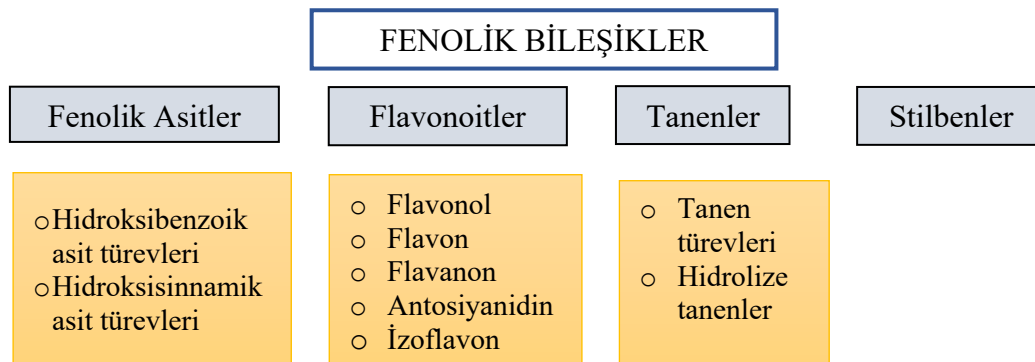
Hiperpigmentasyon tedavisinde tıbbi bitkilerin önemi, ciltteki renk değişikliği sorunlarını etkili bir şekilde çözme potansiyellerinde yatmaktadır. Bitkiler, pigmentasyon kontrolüne yardımcı olduğu tespit edilen çeşitli kimyasal gruplardan biyoaktif bileşenler taşır. Bu bileşikler, hiperpigmentasyonun tedavisinde daha hafif, daha güvenli ve uygun maliyetli özellikleriyle giderek daha fazla ilgi çekmektedir (LF ve diğerleri, 2021). Ek olarak, C ve E vitaminleri ile ahududu yaprağı gibi bitkisel ekstraktlar içeren topikal tedaviler, klinik çalışmalarda yaşlanma karşıtı ve cilt parlaklaştırıcı etkiler göstermiştir; bu da bitkisel formülasyonların hiperpigmentasyonun tedavisindeki terapötik potansiyelini vurgulamaktadır (Rattanawiwatpong ve diğerleri, 2012).

Cilt rengini açıcı kozmetikler genellikle lekeleri, pigmentasyon bozukluklarını veya cilt tonu eşitsizliklerini hafifletmek veya gidermek için kullanılır. Bunlar genellikle kremler, losyonlar veya serumlar şeklindedir. Ancak, cilt rengini açıcı ürünler kullanırken dikkatli olunması önemlidir. Çünkü bu amaçla kullanılan bazı ajanlar cilde zarar verebilir veya yan etkilere neden olabilir. Cilt rengini açıcı ürünler kullanırken güneş koruyucu kullanmak önemlidir. Çünkü bu ürünler cildi daha hassas hale getirebilir ve güneşe maruz kaldığında cilt lekeleri daha da belirgin hale gelebilir. Cilt rengini açıcı ürünler genellikle birçok farklı aktif bileşen içerir. Örneğin, arbutin, C vitamini, kojik asit, azelaik asit gibi bileşenler cilt tonunu açma özelliğine sahiptir. Ancak, herhangi bir alerji riskine karşı içerikleri kontrol etmek önemlidir. Arbutin, C vitamini, kojik asit ve azelaik asit gibi bileşenler genellikle cilt rengini açma veya lekeleri hafifletme gibi amaçlarla kullanılan kozmetik ürünlerde bulunan

aktif maddelerdir. Her birinin kendi yan etkileri olabilir. Nadir durumlarda, arbutin ciltte tahrişe veya kızarıklığa neden olabilir. Özellikle hassas cilde sahip kişilerde dikkatli kullanılmalıdır. C vitamini, antioksidan özelliklere sahiptir ve ciltte lekelerin görünümünü azaltabilir. Yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında ciltte hafif bir yanma veya kaşıntıya neden olabilir. Ayrıca, bazı kişilerde alerjik reaksiyonlara yol açabilir. Kojik asit, hassas ciltlerde kızarıklık, kaşıntı veya tahriş gibi yan etkilere neden olabilir. Ayrıca, uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlarda kullanımında ciltte renk değişiklikleri görülebilir. Azelaik asit, ciltte kuruluk, kızarıklık, yanma veya kaşıntı ile nadir durumlarda alerjik reaksiyonlara yol açabilir. Bu nedenle daha etkili ve güvenli cilt rengini açıcı yeni ajanların bulunmasına ihtiyaç vardır. Bitkilerin cilt rengini açan kozmetiklerde kullanımına ilişkin klinik kanıtların gözden geçirilmesi, hiperpigmentasyonu tedavi etmek için bitkisel ürünleri cilt bakımı rutinlerine dahil etmenin önemini vurgulamaktadır. Bu kolektif kanıt, dermatoloji ve kozmetik uygulamalarda bitkisel bazlı formülasyonların geliştirilmesine katkıda bulunarak hiperpigmentasyona yönelik alternatif ve potansiyel olarak faydalı tedaviler sunmada bitkilerin oynadığı değerli rolün altını çizmektedir.

2.4. Fenolik Bileşikler

Bitkilerdeki en yaygın sekonder metabolit gruplarının başında gelen fenolik bileşikler aromatik halkaya bağlanmış karbon sayısına göre alt gruplara ayrılmaktadır. Bu bileşikler basit fenoller (C_6), fenolik asitler (C_6-C_1), fenolik alkoller, asetofenonlar ve fenil asetik asitler (C_6-C_2), fenil-propanlar (C_6-C_3), naftakinonlar (C_6-C_4), benzofenonlar ve ksantinler ($C_6-C_1-C_6$), stilben ve antrokinonlar ($C_6-C_2-C_6$), flavonoidler ve izoflavonoidler ($C_6-C_3-C_6$) ve polimer fenolik bileşikler (tanenler, lignin ve melanin) olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır (Vermerris ve Nicholson, 2006; Mammadov, 2014).



Şekil 2.5. Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Yukarıda da değinildiği gibi, fenolik bileşikler, bitkilerde bulunan en önemli ve geniş kimyasal gruplardan biri olup, birçok alt sekonder metabolit grubunu kapsamaktadır. Bu alt gruplar arasında basit fenolikler, fenolik asitler, polifenoller, flavonoidler, feniletanoidler, kumarinler, vs. yer almaktadır. Günümüze kadar yaklaşık sayısının 8000'in üzerinde olduğu bildirilen çeşitli gruplardan fenolik bileşikler ile fenoliklerce zengin bitkisel ekstraktların çeşitli biyolojik aktiviteleri (antikanser, antioksidan, anti-enflamatuvar, antidiyabetik, antihiperlipidemik, osteoprotektif, gastroprotektif, immünstimülan, kardiyoprotektif, nöroprotektif, vs) üzerinde tüm dünyada uzun yıllardır yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Bu araştırmalar deneysel ve klinik düzeyde sürdürülmekte olup, fizyolojik ve patofizyolojik yollar üzerinden de etki mekanizmaları açıklanmaya çalışılmaktadır.

Bitki fenolikleri, sağlık üzerine etkilerinden dolayı kozmetik endüstrisinde büyük ilgi görmektedir. Başta polifenoller, flavonoidler ve fenolik asitler olmak üzere bu bileşikler antioksidan, yaşlanma karşıtı ve cilt koruyucu etkileriyle tanınmaktadır (Shin ve diğerleri, 2019). Bitki ekstraktlarında bulunan fenoller ve polifenolik bileşikler, antioksidan özellikleri nedeniyle kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır (Nizioi Lukaszewska ve diğerleri, 2020).

Araştırmalar, fenolik bileşikler açısından zengin bitki ekstraktlarının, antioksidan potansiyellerini artırmak için kozmetik krem formülasyonlarına entegre edilebileceğini göstermiştir. Ek olarak, bitki fenoliklerinin cilt bakım ürünlerinde kullanımı, yaşlanma karşıtı (anti-wrinkle) özelliklerinden dolayı önemlidir (Nascimento ve diğerleri, 2021). Bitki fenoliklerinin kozmetik formülasyonlara dahil edilmesi, bunların serbest radikalleri temizleme, UV hasarına karşı koruma ve cilt sağlığını geliştirme kapasiteleriyle ilişkilendirilmiştir (Marijan ve diğerleri, 2023; Malarz ve diğerleri, 2023).

Antioksidanlar temel olarak doğal ve sentetik antioksidanlar olmak üzere iki grupta sınıflandırılır. Doğal antioksidanlar temel olarak sebzeler, kabuklu yemişlerin yanı sıra, bitkilerin tohumlar, kökler, yapraklar, gövde ve gövde kabuğu gibi hemen hemen her kısmında bulunabilen fenoliklerdir. Fenolik bileşiklerin temel yapısı en azından bir veya daha fazla hidroksil grubuna bağlı bir fenol halkasından oluşur. Polifenoller doğada yaygın olarak bulunur ve bitkilerde en çok bulunan sekonder metabolitler olarak kabul edilmektedir.

Bitkisel fenolikler ile hiperpigmentasyonun tedavisine yönelik ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Fenolik bileşikler içeren bitkisel ekstraktlar, melanin üretiminde rol oynayan bir

enzim olan TYR'ı inhibe etme yeteneklerinden dolayı cilt rengini açan kozmetiklerde kullanılmaktadır (Parvez ve diğerleri, 2007; Gonzales-Castañeda ve diğerleri, 2011). Bu bileşikler, UV radyasyonunun neden olduğu hiperpigmentasyonun azaltılmasında etki göstermiştir (Jeong ve diğerleri, 2017). Ek olarak, bitki kaynaklı fenolik bileşiklerin melanogenezi inhibe ettiği ve cilt hiperpigmentasyonunun tedavisinde potansiyel faydalar sağladığı bulunmuştur. Bu bileşikler yalnızca antioksidan özelliklere sahip olmakla kalmamakta, aynı zamanda anti-enflamatuvar etki de göstermektedir. Bitki fenoliklerinin cilt bakımı formülasyonlarına dahil edilmesi, hiperpigmentasyonun yönetilmesinde güvenli ve etkili bir yaklaşım ile potansiyel yan etkileri olan mevcut tedavilere alternatif olarak görülmektedir. Bitki fenoliklerinin TYR inhibe edici ve antioksidan özellikleri nedeniyle içeriğinde yer aldığı cilt bakım ürünleri, genel cilt sağlığını desteklerken hiperpigmentasyonu da hedeflemektedir.

Çalışmalarımızda test edilen 36 adet fenolik bileşik ve kimyasal grupları Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Tez çalışmalarımızda test edilen fenolik bileşikler ve kimyasal grupları

| No. | Bileşik İsmi | Kimyasal Grup |
|-----|----------------------------|--|
| 1 | Gallik asit | Hidroksibenzoik asit |
| 2 | Sirinjik asit | Hidroksibenzoik asit |
| 3 | Vanilik asit | Hidroksibenzoik asit |
| 4 | Klorojenik asit | Kafeik asit ve (-)-kinik asitin esteri |
| 5 | Elajik asit | Gallik asidin dimerik türevi |
| 6 | <i>Trans</i> -Ferulik asit | Hidroksisinnamik asit |
| 7 | <i>p</i> -Kumarik asit | Hidroksisinnamik asit |
| 8 | Kafeik asit | Hidroksisinnamik asit |
| 9 | Rozmarinik asit | Kafeik asit esteri |
| 10 | D(-)-Kinik asit | Sikloheksankarboksilik asit |
| 11 | Oleuropein | Sekoiridoit glikozit |
| 12 | <i>p</i> -Tirozol | Fenetil alkol |
| 13 | Hidroksitirozol | Fenetil alkol |
| 14 | Pelargonidin | Antosiyandin |
| 15 | Resveratrol | Stilben |
| 16 | Kateşin | Flavan-3-ol |
| 17 | EGCG | Flavan-3-ol |
| 18 | Kersetin | Flavonol |
| 19 | Kemferol | Flavonol |
| 20 | Mirisetin | Flavonol |
| 21 | Fisetin | Flavonol |
| 22 | Hiperosit | Flavonol glikozit |
| 23 | Luteolin | Flavon |
| 24 | Apigenin | Flavon |

Çizelge 2.1. (devam) Tez çalışmalarımızda test edilen fenolik bileşikler ve kimyasal grupları

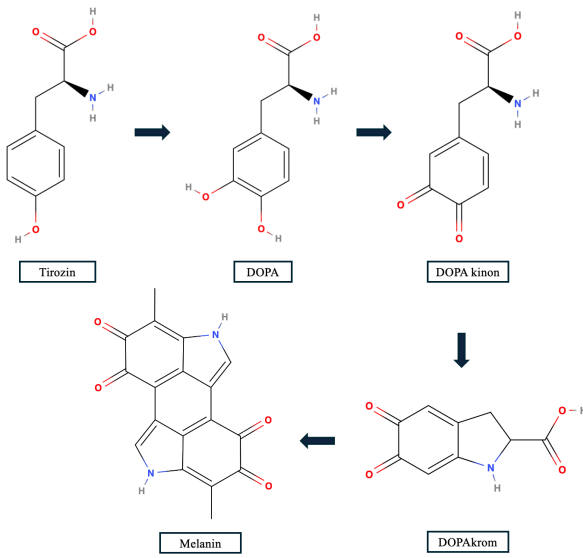
| | | |
|----|--------------|-----------------------|
| 25 | Taksifolin | Flavononol |
| 26 | Trisin | Metoksiflavon |
| 27 | Tangeretin | Metoksiflavon |
| 28 | Diosmetin | Metoksiflavon |
| 29 | Hesperetin | Flavanon |
| 30 | Naringin | Flavanon 7-O-glikozit |
| 31 | İzokersitrin | Flavanon 3-O-glikozit |
| 32 | Orientin | Flavon 8-C-glikozit |
| 33 | Viteksin | Flavon 8-C-glikozit |
| 34 | Daidzein | İzoflavon |
| 35 | Glisitein | İzoflavon |
| 36 | Amentoflavon | Biflavonoit |

2.5. Tirozinaz (TYR)

TYR (EC 1.14.18.1), monofenollerin *O*-difenollere (monofenolaz) *O*-hidroksilasyonunu ve *O*-difenollerin *O*-kinonlara (difenolaz) oksidasyonunu katalize eden bakır içeren bir monooksijenazdır. TYR iki farklı reaksiyonu katalize eder; fenolleri kateşollere dönüştürür ve ayrıca melanin biyosentezi sırasında katekolleri kinonlara oksitler. TYR, tirozinin L-DOPA'ya *O*-hidroksilasyonu ve L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonu yoluyla melanin sentezinde rol oynar ve bu da çoklu enzimatik işlemlerle melanine dönüşmektedir. TYR, melanin biyosentezinde yer alan ve üretilen melanin miktarının düzenlenmesinde merkezi bir rol oynayan önemli bir enzimdir (Ando ve diğerleri, 2007). Melanin pigmentinin biyosentetik yolundaki hız sınırlayıcı adımı katalize eder (Kim ve diğerleri, 2002). TYR, farklı mikroorganizmalardan insana kadar organizmalarda bulunur ve moleküler yapı ile katalitik özellikler açısından benzerlikler gösterir (Maamoun ve diğerleri, 2021). TYR daha yaygın olarak bitkilerde bulunmasına rağmen, mikroorganizmalarda genellikle mikrofunguslarda, hayvanlarda ve insanlarda bulunur (Cooksey ve diğerleri, 1997; Parvez ve diğerleri, 2007; Khan, 2006).

TYR inhibitörleri, melanin üretimini düzenleyen enzim olan TYR'ın aktivitesini inhibe ederek melanin üretiminin düzenlenmesinde etkili olurlar. Hayvanlarda melanizasyondan, bitkilerde ise kahverengileşmeden sorumlu, bakır içeren çok fonksiyonlu bir enzimdir (Kim ve diğerleri, 2018). TYR geniş bir substrat spesifikliğine sahiptir ve D-izomerlere kıyasla L-izomerler için daha yüksek bir afinite gösterir. Enzim, tirozinden melanin üretimine yol açan reaksiyon kademesindeki başlangıç ve hız sınırlayıcı adımı katalize eder (Tsukamoto ve diğerleri, 1992). TYR inhibitörleri, farmasötikler ve kozmetikler, gıda biyoprosesleri ile

çevre sektörleri dahil olmak üzere çeşitli endüstrilerdeki potansiyel uygulamaları nedeniyle ilgi çekmektedir (Zaidi ve diğerleri, 2014). Gıda endüstrisinde TYR inhibitörleri, meyve ve sebzelerin kalitesinin ve ekonomisinin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (Kim ve Uyama, 2005). Çeşitli çalışmalar, doğal ve sentetik kökenli TYR inhibitörlerinin tanımlanmasına odaklanmıştır (Masum ve diğerleri, 2019). Bu inhibitörler, TYR aktivitesini ve melanojenik proteinlerin ekspresyonunu negatif yöne doğru düzenleyerek melanogenez düzenleme etkisine sahiptir (Uto ve diğerleri, 2022; Kwon ve diğerleri, 2014). Sonuç olarak TYR, melanin biyosentezinde çeşitli endüstrilerde etkileri olan anahtar bir enzimdir.



Şekil 2.6. Melanin biyosentezi (Agarval ve diğerleri, 2019)

2.5.1. TYR inhibitörleri

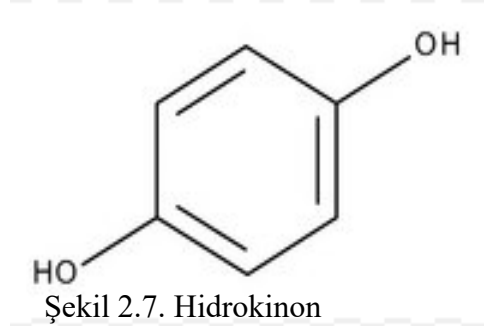
TYR inhibitörleri ile ilgili tıp, eczacılık, kozmetik ve gıda gibi çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamaları nedeniyle yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Daha etkili ve güvenli TYR inhibitörlerinin keşfedilmesine yönelik ilgi, bitkiler, mantarlar, mikroorganizmalar ve diğer biyolojik ürünler de dahil olmak üzere çeşitli doğal kaynakların araştırılmasına yol açmıştır (Chang, 2009; Kim ve Uyama, 2005; Ashooriha ve diğerleri, 2022; Ubeid ve diğerleri, 2009). Hidrokinon, kojik asit, azelaik asit, elektron açısından zengin fenoller ve arbutin gibi birçok TYR inhibitörü, melaninin aşırı üretimini önleyici etkileri nedeniyle kozmesötiklerde kullanılmaktadır. Bu inhibitörler, Anacardiaceae, Araceae, Asteraceae, Cannabinaceae, Celastraceae, Convolvulaceae, Ephedraceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Orchidaceae ve Solanaceae gibi familyalara mensup bitki türlerinden izole edilirken enzimin

aşırı aktivitesi, meyve ve mantarlarda enzimatik kahverengileşmenin yanı sıra, insanlarda hiperpigmentasyon ve melanomadan sorumludur. Benzaldehit ve benzoat türevleri, flavonoidler, rezorsinoller, kojik asit ve oligopeptitler gibi doğal bileşiklerin TYR inhibitörleri olarak potansiyeli araştırılmıştır (Okombi ve diğerleri, 2005; Zhu ve diğerleri, 2014; Kubo ve Kinst-Hori, 1999). Ayrıca bu doğal bileşiklerin inhibisyon mekanizmaları araştırılmıştır. Örneğin, TYR inhibitörlerinin inhibisyon kapasitesinin, TYR'in aktif merkezinde bulunan bakır atomları ile inhibitör bileşik (ligant) arasındaki şelasyonun derecesi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Zhu ve diğerleri, 2014). Ayrıca, doğal bileşiklerden türetilen tripeptitlerin anahtar amino asitlerinin yapısal ve fonksiyonel rolleri araştırılmış ve TYR inhibitörlerinin geliştirilmesine yönelik bilgiler sağlanmıştır (Hsiao ve diğerleri, 2014). Doğal olarak türetilmiş TYR inhibitörlerinin potansiyel uygulamaları çeşitlidir. Cilt pigmentasyonunu düzenlemede, melanogenez bozukluklarını tedavi etmede ve cilt hiperpigmentasyonlarını gidermede kullanımları araştırılmıştır (Stanković ve diğerleri, 2019; Lin ve diğerleri, 2015). Sonuç olarak, doğal kaynaklı TYR inhibitörlerinin araştırılması, çeşitli alanlarda potansiyel uygulamalara sahip ümit verici bileşikler ortaya çıkarmaktadır.

Flavonoidler doğal TYR inhibitörleri arasında en büyük grubu teşkil etmektedir. Bazı flavonoidler TYR'a karşı inhibitör aktivite gösterirken (No,1999 Xie ve diğerleri 2003), kateşin ve ramnetin gibi bazı flavonoidler de substrat olarak davranır ve bir kofaktör olarak TYR aktivitesini baskılar veya ramnetin gibi bazı flavonoidler serbest radikal süpürücü olarak hareket eder (Kim, 2013). "Çin dutu" olarak bilinen *Cudrania tricuspidata* (Carriere)Bur. ex Lav. (Moraceae) dallarından bir dizi flavonoid türevidir izole edilmiştir ve bir flavanon türevidir olan steppogenin, referans inhibitör olan kojik asitten 10 kat daha yüksek düzeyde TYR inhibitör aktivitesi göstermiştir (Zehng ve diğerleri, 2013).

Hidrokinon, hidroksifenol yapısında kinonik bir bileşiktir (Şekil 2.7.) ve TYR enzimini baskılayarak DOPA'nın melanine dönüşümünü önlemektedir. Ayrıca melanozomların oluşum ve ayrışması ile melanositlerde DNA ve RNA sentezini engelleyerek işlev görmektedir. Hidrokinon uzun süre, hiperpigmentasyonun tedavisinde standart tedavi olarak kabul edilmiştir. Ancak enzimatik reaksiyon sırasında oluşan semikinon içermeyen radikaller melanozom ve melanositlerde kalıcı hasara neden olmaktadır. Ayrıca bu maddenin epidermisten damar sistemine hızla taşındığı ve karaciğerde detoksifiye edildiği fark edilmiştir (Wester, 1998). Uzun süreli kullanımdan kaynaklanan kalıcı depigmentasyon ve

ekzojen okronozis gibi yan etkileri nedeniyle hidrokinonun çoğu ülke tarafından kozmetikte kullanımını yasaklanmıştır.

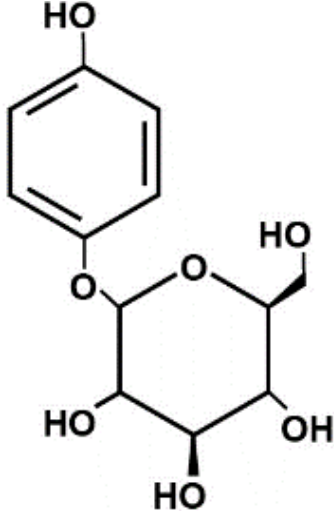


Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) reçetesiz olarak % 2'ye kadar olan konsantrasyonlarda ve reçeteli olarak daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Avrupa'da ise en fazla % 2 oranında güvenli ve etkili kabul edilmektedir. Hidrokinon ile tretinoin ve glikolik asit olmak üzere diğer maddeleri içeren kombine preparatların kullanılmasının etkiyi arttırdığı görülmektedir. Hidrokinonun cilt rengini açıcı etkisi, günlük uygulamalarda genellikle birkaç hafta ile birkaç ay arasında ortaya çıkmaktadır (Resim 2.4.). Etkisi konsantrasyona, taşıyıcıya ve formülasyonun stabilitesi gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Genel olarak konsantrasyon arttıkça etkisi de artmakta fakat daha iritan hale gelmektedir. Yan etkileri nedeniyle % 5 üzerindeki konsantrasyonları önerilmemektedir. En sık görülen yan etkiler irritasyon, kuruluk, kaşıntı, alerjik reaksiyonlar ve tırnak hiperpigmentasyonudur. Ayrıca uygulama alanının dışındaki bölgelerde hipopigmentasyon veya vitiligo benzeri depigmentasyon gibi şiddetli yan etkiler de görülebilmektedir. Yüksek konsantrasyonlarla yapılan uzun süreli tedaviler sırasında kalıcı depigmentasyon oluşabilir. Kullanımı doktor kontrolünde, geceleri bir doz olacak şekilde ve gün boyunca yüksek koruma faktörlü bir güneş filtresi kullanarak olmalıdır. Etkisini 3-4 ayda göstermesi beklenir. Hidrokinon son derece reaktif olup, melanositler için güçlü bir sitotoksik ve mutajenik bileşiktir. Hidrokinon içeren kremlerin rengi 3-4 ay sonunda beyazdan kahverengiye dönüşmektedir. Bu nedenle ABD dışında hidrokinonun sadece ilaç olarak kullanılmasına, kozmetik ürünlerde ise kullanılmamasına karar verilmiştir (Liu ve diğerleri, 2022).



Resim 2.4. Hidrokinon içeren ürün örneği

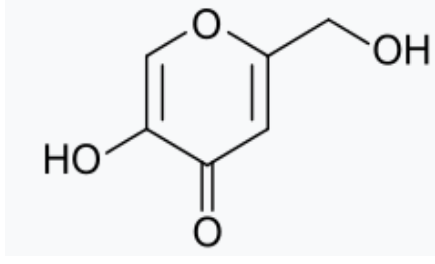
Arbutin (Şekil 2.8.), önemli inhibitör aktivite sergileyen önemli bir TYR inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Hiperpigmentasyon bozukluklarının tedavisinde ve kozmetik ürünlerde cilt rengini açıcı madde olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Masum ve diğerleri, 2019). Arbutinin ana etki şekli, bir TYR inhibitörü gibi davranarak melanin sentezini inhibe etmektir (Tangau ve diğerleri, 2022). Hidrokinonun glikozile edilmiş bir türevi olan arbutin, özellikle cilt sağlığı ve hiperpigmentasyon bağlamında terapötik potansiyeli nedeniyle büyük ilgi görmüştür. Çalışmalar, arbutinin TYR aktivitesinin inhibisyonu yoluyla melanin biyosentezi üzerindeki inhibitör etkilerini vurgulamıştır. Arbutinin, melanin sentezinde anahtar bir enzim olan TYR'ı kompetitif bir şekilde inhibe ettiği ve bu özelliği ile kozmetik ürünler için cilt rengini açıcı ajanlar içinde değerli bir bileşen haline geldiği gösterilmiştir (Tai ve diğerleri, 2016). İlaveten, arbutinin cilt pigmentasyonunun düzenlenmesi için çok önemli olan TYR aktivitesini inhibe ederek melanin biyosentezini azalttığı da rapor edilmiştir (Lim ve diğerleri, 2009). Ayrıca, arbutinin depigmentasyon mekanizmasına ilişkin yapısal kriterler araştırılmış ve mantar TYR'ı tarafından katalize edilen L-DOPA'nın oksidasyonu üzerinde doza bağlı bir inhibitör etki ortaya konmuştur (Hori ve diğerleri, 2004). Ayrıca arbutin, güçlü antioksidan özellikleri ve cilt sağlığının ötesinde çeşitli uygulamalardaki potansiyeli açısından araştırılmıştır. Çalışmalar, arbutinin oksidatif stresin neden olduğu hücre hasarıyla mücadele edebilen antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Bonifacio ve diğerleri, 2020).



Şekil 2.8. Arbutinin kimyasal yapısı

Ancak son bulgular arbutinin hem güvenliği hem de yan etkileri konusunda kaygıları artırmıştır. İnhibitör etkilerine ek olarak, arbutinin transdermal iletimi ve cilt beyazlatma etkisi sağlama potansiyeli araştırılmıştır. Arbutinin asetillenmiş türevi, arbutin ile karşılaştırıldığında TYR aktivitesinin inhibisyonu ve melanin üretiminin azaltılması açısından daha yüksek etkinlik göstermiştir. Ayrıca α -arbutinin insan TYR'ı üzerindeki inhibitör aktivitesi hala bilinmemektedir. Arbutin undesilenik asit esterinin enzimatik sentezi, mantar TYR'ı üzerindeki inhibitör etkisi açısından da araştırılmıştır. Bu, arbutinin cilt beyazlatma amacıyla yaygın şekilde kullanıldığını vurgulamaktadır. Yapılan çalışmalar, arbutinin güvenlik endişelerini ve yan etkilerini ele almak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamıştır (Cheng ve diğerleri, 2006). Ek olarak, arbutinin insan derisi bakterileri tarafından hidrokinona hidrolizinin rapor edilmesi, bunun potansiyel toksisitesi ve güvenlik etkileriyle ilgili endişeleri artırmaktadır (Bang ve diğerleri, 2008). Ancak güvenli kullanımı için güvenlik profilinin ve potansiyel olumsuz etkilerinin kapsamlı değerlendirmesi esastır.

Aloesin ve arbutinin beraber kullanımı üzerinde çalışılmış ve her ikisinin de TYR aktivitesini farklı mekanizmalarla hareket ederek sinerjik bir biçimde inhibe ettiği bulunmuştur; aloesin yarışmasız olarak inhibe ederken arbutin yarışmalı olarak inhibe etmektedir. İkisi birlikte ele alındığında yarışmalı ve yarışmasız inhibisyon mekanizmaları ile melanin üretimini sinerjik olarak inhibe edilmektedir. Dolayısıyla, aloesin ve arbutin karışımının depigmentasyon etkisi için kullanımı daha faydalıdır (Wiley, 1942).



Şekil 2.9. α -Kojik asit

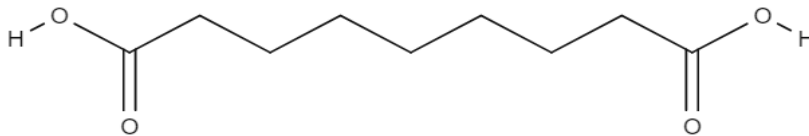
Kozmetik uygulamalarına ek olarak α -kojik asit, antioksidan özellikleri açısından da incelenmiştir. α -Kojik asit içeren ekstraler antioksidan potansiyelleri açısından değerlendirilmiş ve sonuçlar önemli antioksidan aktiviteye işaret etmiştir (Zengin ve diğerleri, 2021). Ayrıca α -kojik asidin amilaz ve glukozidaz gibi diğer enzim hedefleri için de inhibitör olma potansiyeline sahip olabileceği öne sürülmektedir (Uysal ve diğerleri, 2016). α -Kojik asit sıklıkla kozmetik formülasyonlarda hidrokinon, azelaik asit, niyasinamid, retinoitler, C vitamini, glikolik asit, arbutin, mekinol, alosein ve *N*-asetil glukozamin gibi diğer depigmentasyon ajanlarıyla kombinasyon halinde kullanılır (Koşar ve diğerleri, 2022). Bu husus, çok yönlülüğünü ve diğer cilt bakımı bileşenleriyle uyumluluğunu göstermektedir (Resim 2.6).

Ancak yüksek dozda α -kojik asidin olumsuz etkileri bulunmaktadır. Toksikogenomik çalışmalar, yüksek dozda α -kojik asidin tiroit fonksiyonunu etkileyebileceğini, triiyodotironin (T3) ve tiroksinde (T4) azalmaya ve tiroit uyarıcı hormonda (tyroid-stimulating hormone, TSH) artışa yol açabileceğini göstermiştir (Cheng ve diğerleri, 2006). Ek olarak, α -kojik asidin cilt tahrişi ve kızarıklığa neden olması, olumsuz cilt reaksiyonlarına yol açma potansiyelini vurgulamaktadır (Zilles ve diğerleri, 2022). Ayrıca, çalışmalar α -kojik asidin dezavantajları olarak sitotoksisite ve depolamadaki dengesizliği de bildirmiştir (Singh ve diğerleri, 2016). α -kojik asidin karaciğer tümörünü teşvik edici etkilerle ilişkili olduğunu da belirtilmektedir (Burnett ve diğerleri, 2010). Ancak α -kojik asidin kozmetik ve dermatolojik uygulamalarda kullanılmasıyla ilişkili potansiyel yan etkilerin ve güvenlik endişelerinin dikkate alınması önemlidir. Sonuç olarak, α -kojik asit ve türevleri melanin oluşumunu ve TYR aktivitesini engellemede umut verici etkiler gösterse de özellikle yüksek dozlarda potansiyel yan etkilerin ve güvenlik profilinin dikkatle değerlendirilmesi çok önemlidir.



Resim 2.6. α-Kojik asit içeren bazı kozmetik ürünler

Doğal olarak oluşan bir dikarboksilik asit olan azelaik asitin (Şekil 2.10.), anti-enflamatuvar ve antioksidatif etkilerin yanı sıra antibiyotiğe dirençli bakteri türleri de dahil olmak üzere bir dizi Gram-negatif ve Gram-pozitif mikroorganizmaya karşı bakterisidal özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Sieber ve Hegel, 2013). İlaveten azelaik asidin melazma ve akne gibi durumların tedavisindeki etkinliği araştırılmıştır. Çalışmalar, azelaik asit kullanımında pigment yoğunluğunda önemli bir düşüş olduğunu göstermiştir ki, bu da melazma tedavisindeki potansiyeline işaret etmektedir (Farshi, 2011). Ayrıca, azelaik asidin anti-enflamatuvar, antibakteriyel ve antikeratinizasyon etkilerine sahip olduğu bulunmuştur (Faghihi ve diğerleri, 2017).



Şekil 2.10. Azelaik asit

Ancak azelaik asitle ilişkili potansiyel olumsuz etkilerin dikkate alınması gerekmektedir. Yaygın olumsuz kutanöz etkiler arasında yanma, batma, karıncalanma ve kaşıntı yer almaktadır (Buonomo ve diğerleri, 2021). Ayrıca azelaik asidin topikal uygulaması, tolere edilebilirliğini ve etkinliğini etkileyebilecek tahriş ve düşük geçirgenlik gibi problemlerle ilişkilendirilmiştir (Salimi ve diğerleri, 2020). Bu da etkinliğini ve tolere edilebilirliğini arttırmak için dağıtım sistemlerinin daha fazla araştırılması ve geliştirilmesi ihtiyacını vurgulamaktadır (Gomes ve diğerleri, 2013). Sonuç olarak, azelaik asitin melazma ve akne vulgaris dahil olmak üzere çeşitli dermatolojik durumların tedavisinde potansiyel terapötik

etkiler gösterdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, olumsuz kutanöz etkileri ve formülasyon zorlukları, klinik pratikte kullanımını optimize etmek için daha fazla araştırma yapılmasını gerektirmektedir.



Resim 2.7. Azelaik asit içeren bazı kozmetik ürünler

2.6. Elastaz

Elastin, cildin mekanik özelliklerinin korunmasından sorumlu olan önemli bir matris proteindir. Elastinin bozulması, doğrudan cilt yaşlanması ve oksidatif stresle ilişkili bir süreç olan elastaz enziminin aktivitesi sonucu oluşmaktadır. Elastaz, artan aktivitesi sedef hastalığı ve uzun süreli yara iyileşmesi gibi çeşitli rahatsızlıklar ve cilt problemleriyle ilişkili olan bir proteaz tipi bir enzimdir. Artan elastaz aktivitesi ve buna bağlı olarak elastin bozulması cilt elastikiyeti kaybının, erken cilt yaşlanmasının ve kırışıklık oluşumunun en önemli nedenleri arasındadır.

Elastaz inhibitörleri iltihaplanma, doku onarımı ve cilt sağlığı dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar. Flavonoidlerin, insan nötrofil elastazının etkili inhibitörleri olarak tanımlanmış olması, bunların elastaz aktivitesini modüle etme potansiyelini ortaya koymaktadır (Jakimiuk ve diğerleri, 2021). Ek olarak, *p*-kumarik asit gibi doğal bileşikler ve *Astilbe chinensis* (Maxim.)Franch.&Sav. gibi bitki ekstraktları dikkate değer oranda anti-melanojenik ve anti-elastaz aktivite göstermiştir. Bu örnekler doğal kaynakların cilt rengini açma ve yaşlanma karşıtı formülasyonlardaki potansiyellerini göstermektedir (Lee ve diğerleri, 2009). Çalışmalar aynı zamanda terapötik uygulamalar için yeni inhibitörler geliştirmeyi amaçlayan sentetik peptitlerin ve elastazlar için yeni ligantların

tasarımı ve sentezi üzerine de odaklanmıştır (Vasconcelos ve diğerleri, 2010; Filippusson ve diğerleri, 2000).

2.7. Kolajenaz

Kolajen, dermisin yaklaşık % 80-90'ını oluşturan baskın bir proteindir. Elastin lifleri cildin uzayabilirliğine katkıda bulunurken, kolajen cilt dokusunun gerilme mukavemetine ve stabilitesine katkıda bulunur. Kolajenazlar, hücre dışı matrikste aktif olan ve kolajenin bozulmasına katkıda bulunan enzimlerdir. Örneğin, interstisyel kollajenaz (MMP-1), dermisin ana bileşeni olan tip I kolajeni hidrolize edebilir ve dolayısıyla dermal hücre dışı matrisin düzensizliği ve ilerleyici dejenerasyonunda çok önemli bir rol oynar. Yaşlanma ve çeşitli dış etkiler (UV radyasyonu) ile birlikte aktivitesi artar ve kırışıklık oluşumuna ve cilt tonunun kaybına yol açar (Marijan ve diğerleri, 2023).

Hiperpigmentasyon tedavisinde kullanılan önemli bir enzim klostridial kolajenazdır. Bu enzim, çeşitli fibro-proliferatif bozuklukların tedavisinde kullanılan önemli proteolitik enzimlerden biri olarak kabul edilmektedir (Krishnamoorthy ve diğerleri, 2018). Ayrıca, mikrobiyal kolajenaz içeren ürünlerin doku debridmanı tedavisinde kullanıldığı ve granülasyon ve epitelizasyon süreçlerine destek olduğu belirtilmektedir (Slovakova ve diğerleri, 2022)

2.8. Ksantin Oksidaz (XO)

XO, gut gibi durumlarda önemli bir süreç olan hipoksantin ve ksantinün ürik asite oksidasyonunda çok önemli bir rol oynayan bir enzimdir. XO, dehidrojenaz formunda mevcut olmasına rağmen, kolaylıkla bir oksidaz formuna dönüştürülebilir (Masuoka ve diğerleri, 2006; Pauff ve diğerleri, 2008). Enzim, pürin nükleotit metabolizmasında yer alan kompleks bir molibdo-flavo enzimdir (Sharma ve diğerleri, 2015). Çalışmalar, XO'nun likuiritigenin, izolikuiritigenin ve kersetin gibi flavonoid türevleri (Kong ve diğerleri, 2000; Hendriani ve diğerleri, 2017; Jeyabalan ve diğerleri, 2017), alkil gallatlar (Chekol, 2019) gibi çeşitli doğal bileşikler tarafından inhibe edilebileceğini göstermiştir. Enzimin molibden bölgesindeki substrat spesifikliğı, katalitik aktivitesi için çok önemlidir (Malikhah ve Herdyastuti, 2023).

Hipoksantin ve ksantinin ürik asite dönüşümünde rol oynayan bir enzim olan XO'ın oksidan etkisi de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Araştırmalar, XO'ın egzersiz sırasında serbest radikallerin üretimi yoluyla oksidatif strese katkıda bulunabileceğini göstermiştir. XO'ın allopurinol ile inhibisyonunun, oksidatif stresi ve yorucu egzersizle ilişkili kas hasarını azalttığı bulunmuştur (Vinna ve diğerleri, 2000). Ayrıca, XO inhibitörlerinin metabolik sendrom gibi durumlarda oksidatif stresi azaltma potansiyelleri araştırılmıştır (Feoli ve diğerleri, 2014). Ek olarak *Averrhoa bilimbi* L. yapraklarından izole edilen bileşikler, antioksidan ve XO inhibitör aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir (Ahmed ve diğerleri, 2018). XO hem ürik asit metabolizmasında önemli bir rol oynamakta olup, hem de oksidatif stres ve antioksidan mekanizmalar üzerinde de etkileri mevcuttur. Ayrıca, XO'ın kardiyovasküler risk faktörleriyle ilişkilendirilmesi, onun oksidatif stresle ilişkili durumlardaki rolünü vurgulamaktadır (Tam ve diğerleri, 2014). Enzimin aktivitesi yetişkinlerde endotel disfonksiyonu ve kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılıdır (White ve diğerleri, 1996).

XO'ın inhibisyonu, hiperpigmentasyon tedavisiyle ilgilidir; hiperpigmentasyona katkıda bulunan faktörler olan oksidatif stresi ve enflamasyonu potansiyel olarak azaltabilir. XO'ı hedef alan bileşikler, hiperpigmentasyonla ilişkili durumların yönetilmesine yardımcı olabilir (Cos ve diğerleri, 1998). Oksidatif stres, XO ve TYR'in sinerjik inhibisyonu, alternatif etkili moleküllerin keşfine yönelik potansiyel bir yaklaşım olarak görünmektedir (Viet ve diğerleri, 2021).

2.9. Cilt Rengini Açıcı ve Cilt Lekesini Giderici Etkiye Sahip Kozmetik Ürünlerde Kullanılan Formülasyonlar ve Nanoemülsiyonlar

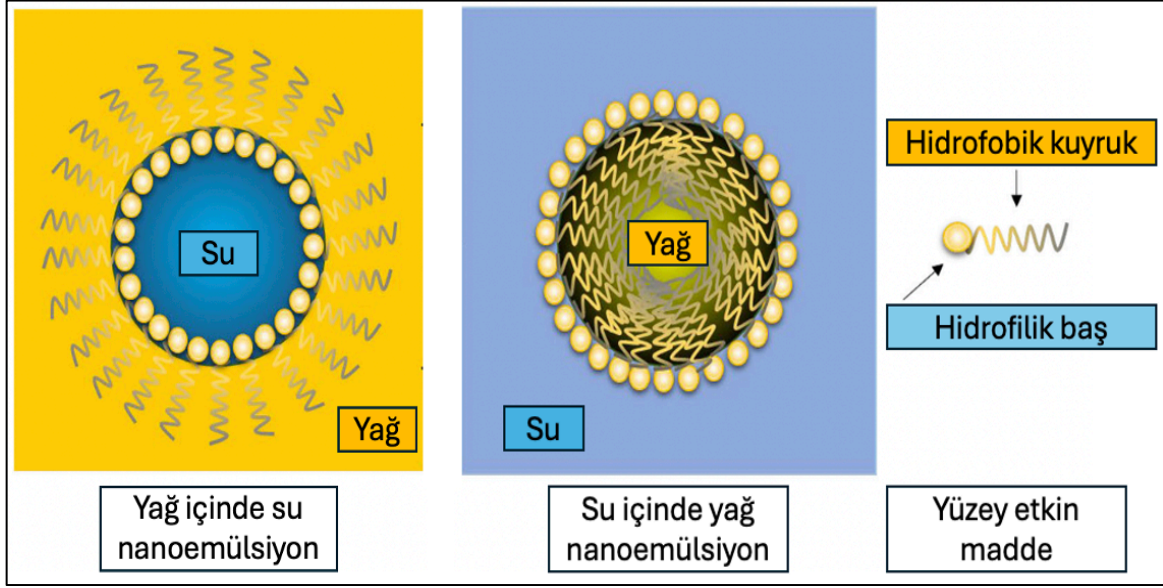
Cilt rengini açma veya cilt beyazlatma, cilt tonunu açmak veya cildi iyileştirmek amacıyla kimyasalların veya pigment giderme potansiyeli olan başka herhangi bir ürünün kullanılması uygulaması olarak tanımlanmaktadır. Cildin fizyolojik pigmentasyonunda bir azalma sağlamak için melanin konsantrasyonunun azaltılmasıyla bu hedeflere ulaşılır. Cilt rengini açıcı bileşiklerin ve formülasyonlarının terapötik endikasyonları genellikle hormonal değişikliklere bağlı renk değişikliği, melazma, yaşlılık lekeleri, yaşlılık/solar lentigo, iltihap sonrası hiperpigmentasyon ve pigmentli akne izleri gibi pigmentasyon bozukluklarının tedavisini amaçlamaktadır. Cilt beyazlatıcılar vücudun belirli bölgelerinde daha homojen bir cilt rengi sağlar (Claudia ve Juliano, 2022). Etkili cilt beyazlatıcı ve cilt lekelerini giderici

ürünlerin potent, hızlı etkili, kısa ve uzun vadede kullanımları güvenli, seçici olarak istenmeyen pigmentasyonun kalıcı ortadan kaldırılmasını sağlayan şekilde formüle edilmesi istenmektedir. Bu amaçla cilt beyazlatıcı ajanlar topikal uygulama amacıyla formülasyonların içerisinde kendi başlarına veya kombine kullanım şeklinde yer almaktadır (Randon ve Gaviria, 2016; Boonme ve diğerleri, 2009; Randon ve Gaviria, 2005) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Kozmesötiklerde kullanılan cilt beyazlatıcı ajanlar, kullanım oranları, formülasyonları ve etki mekanizmaları

| Bileşik | Kullanım Oranı | Etki Mekanizması | Formülasyon tipi |
|------------------------|----------------|-------------------------------------|--|
| Hidrokinon | %2-4 | TYR inhibitörü | Krem, merhem, losyon, jel, çözelti |
| Glikolik asit | %30-70 | Diğer bileşiklerin etkisini artırır | Hidrokinon ile kombine kullanım |
| α -Kojik asit | %1-4 | TYR inhibitörü | Krem, çözelti |
| β -Arbutin | %2-5 | TYR inhibitörü | Lipozom |
| α -Arbutin | %2-5 | TYR inhibitörü | Lipozom |
| Glabridin | %10-40 | TYR inhibitörü | Topikal ürünler |
| Nikotinamid | %2-5 | Melanozom transfer inhibisyonu | Losyon, krem, jel |
| L-Askorbik asit | %2-3 | ROS süpürücü etki | Krem, jel, lipozom, mikroemülsiyon |
| Sodyum Askorbil fosfat | %5 | Melanin oluşumunun inhibisyonu | Losyon, krem, lipozom, mikroemülsiyon |
| Azeleik asit | %15-20 | TYR inhibitörü | Krem, jel |
| Glutasyon | %0,2-%1 | TYR inhibitörü | Jel, topikal emülsiyon, enjeksiyon, kapsül |

Cilt beyazlatıcı bileşiklerin sitotoksik etkilerinin gözlenebilmesi, tüketicilerin sentetik bileşikler ve bunların insan sağlığı açısından temsil edebileceği riskler konusundaki endişeleri nedeniyle günümüzde kozmetik formülasyonların ileri formülasyon yaklaşımları ve doğal bileşikler/hammaddeler ile üretilmesine ilgiyi artırmaktadır. Bileşenlerin sitotoksitesisi, sudaki düşük çözünürlüğü ve düşük stabilite göstermeleri ile geliştirme maliyetleri, formülasyon geliştirmede karşılaşılan temel zorlukları oluşturmaktadır (Burger ve diğerleri, 2016). Cilt beyazlatıcıların hazırlanmasında karşılaşılan zorlukların üstesinden gelmek üzere nanoemülsiyon yaklaşımları ile topikal ürünlerin geliştirilmesi son yıllarda dikkat çekmektedir. Nanoemülsiyonlar, son yıllarda farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde büyük bir ilgi görmüş olup, birçok uygulama alanında kullanılmaktadır. Nanoemülsiyonlar, tipik olarak 20-200 nm boyutunda küresel su damlacıklarının yağ içinde veya yağ damlacıklarının su içerisinde homojen olarak dağılması ile elde edilen kolloidal sistemlerdir (Şekil 2.11). Nanoemülsiyon sistemleri su, yağ ve yüzey etkin maddelerden oluşur.



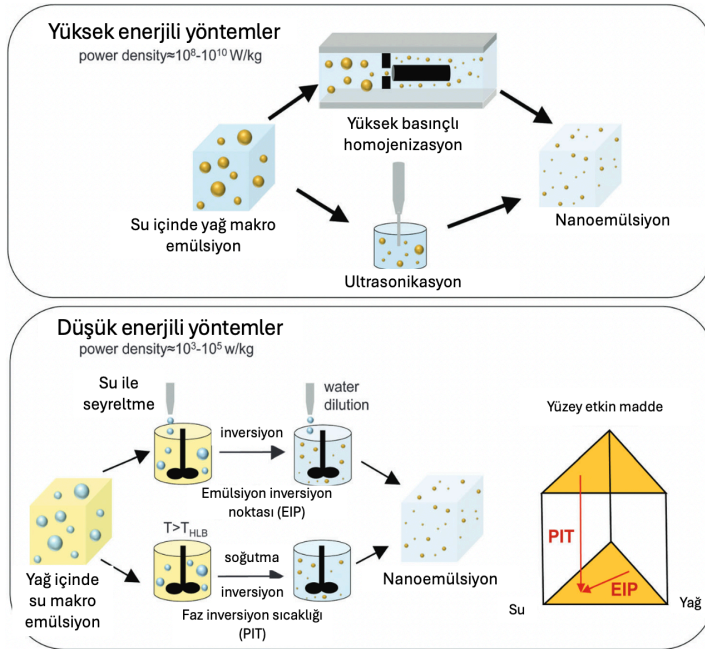
Şekil 2.11. Yağ içinde su ve su içinde yağ tiplerinde nanoemülsiyonlar (Marzuki ve diğerleri 2019)

Nanoemülsiyonlar yüksek hızlı karıştırma, yüksek basınçlı homojenizatör, ultrasonikatör, mikroakınlaştırıcı gibi yüksek enerjili emülsifikasyon yöntemleri veya emülsiyon inversiyon noktası, faz inversiyon sıcaklığı ve kendiliğinden emülsifikasyon gibi düşük enerjili emülsifikasyon yöntemleri ile hazırlanırlar (Al-Edresi ve Baie, 2009; Boonme ve diğerleri, 2009) (Şekil 2.12). Yüksek basınçlı homojenizatör yönteminde 50-100 MPa basınç kullanılarak küçük çaptaki bir delikten geçirilen kaba emülsiyonlarda kayma, çarpışma ve kaviteasyon kuvvetleri oluşur. Kaba emülsiyonlar yoğun türbülans ve hidrolik kayma sayesinde nanoemülsiyonlara dönüşür. Homojenizasyon döngü sayısı, basıncı ve sıcaklık nanoemülsiyonların fiziksel karakteristiklerini belirler. Mikrokanallar ve 2000 psi basınç altında çalışan mikroakınlaştırma yönteminde yağ fazı ve su fazı birlikte sistem içerisine ilave edilir. Döngü sayısı ve basınca bağlı oluşan kaviteasyon kuvvetleri nanoemülsiyonların interaktif kazan içerisinde oluşmasını sağlar.

Ultrasonikasyon yöntemi daha küçük seriler için uygun olan bir yöntemdir. Ultrasonikasyon süresi ve farklı amplitüt değerlerine göre optimize edilen yöntem, büyük damlacıkların nano boyuttaki damlacıklara dönüşmesi için ultrason enerjisi uygulamaktadır. Düşük enerjili emülsifikasyon yöntemlerinden faz inversiyon sıcaklığı (phase inversion temperature, PIT) yönteminde, sistemin Hidrofilik lipofilik dengesini (hydrophilic lipophilic balance, HLB) etkileyen değişen sıcaklığın kaba emülsiyonları nanoemülsiyonlara dönüştürme prensibine dayanır (Maali ve Hamed Mosavian, 2013). Emülsiyon inversiyon noktası (emulsion

inversion point, EIP), emülsiyon üretiminde kritik bir parametredir çünkü bir emülsiyon türünden diğerine, örneğin yağ içinde sudan, su içinde yağ emülsiyonlarına geçişi işaret eder. Bu geçiş, yüzey etkin madde bileşimi, sıcaklık ve dağılan fazın ilave oranı dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir (Ma ve diğerleri, 2014). EIP, emülsiyonun stabilitesini ve reolojik özelliklerini belirlemede çok önemlidir (Liu ve diğerleri, 2020).

Kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi, emülsiyon oluşturmak için dışarıdan enerji girişi veya çalkalama gerektirmeyen bir işlemdir. Bu yöntem, ilaç, kozmetik ve gıda endüstrileri de dahil olmak üzere çeşitli alanlardaki potansiyel uygulamaları nedeniyle kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Kendiliğinden emülsifikasyon mekanizması, emülsiyon formülasyonunu oluşturmak için yüzey etkin maddelerin kullanılmasının yanı sıra, misel oluşumu, gibi ara yüzey gerilimi sayesinde nanoemülsiyon oluşumu sağlar (Schmidt ve diğerleri, 2023; Zheng ve diğerleri, 2022). Kendiliğinden emülsifikasyon yoluyla nanoemülsiyonların oluşumu, kullanılan yüzey etkin maddelerin türü, HLB ve fazlar arasındaki ara yüzey gerilimi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır (Davis ve diğerleri, 2021; Wu ve Firoozabadi, 2021). Hazırlanan nanoemülsiyonlardan sprey, jel, krem, köpük, ince film, losyon ve merhem gibi farklı şekillerde ilaç şekilleri geliştirilebilmektedir.



Şekil 2.12. Nanoemülsiyonların hazırlama yöntemleri (Gupta ve diğerleri, 2016)

Kozmetik endüstrisinde son zamanlarda nanoemülsiyonların kullanımı, birçok avantaj sunmaktadır. Bunlar arasında stratum korneumdan daha iyi cilt penetrasyonu, artan

görülen başlıca stabilite problemleri yağ fazının oksidasyonu, “polimer varlığında sistemin jel formuna dönüşmesi ve kristal büyümesi” olarak da bilinen Ostwald olgunlaşmasıdır. Üretim yöntemi, kullanılan yüzey etkin madde ve yağ fazının tipi ve formülasyondaki kullanım oranları fiziksel stabilite sorunlarının üstesinden gelmek için optimize edilmelidir. Nanoemülsiyonların kozmetik endüstrisinde kullanımı ile ilgili çeşitli formülasyon denemeleri yapılmaktadır (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. Nanoemülsiyon-bazlı kozmetik formülasyonlar (Pandey ve diğerleri, 2020)

| Etkin Madde | Nanoemülsiyon Formülasyonu | Yardımcı Madde | Üretim Yöntemi |
|------------------------------------|----------------------------|---|-------------------------------------|
| Skualen | Nanokrem | Tween 80, span 80, nonilfenol etoksilat | Faz inversiyon sıcaklığı |
| Kolza yağı | Topikal krem | Ksantan zamkı ve karboksi metil selüloz | |
| <i>Centella asiatica</i> ekstresi | Losyon | Tween 80 ve isopropil miristat | Yüksek basınçlı homojenizasyon |
| Kurkumin | Taşıyıcı nanoemülsiyon | Karanfil yağı, Tween 80 ve PEG-400 | Mikrotitrasyon ve ultrasonifikasyon |
| β -Karoten | Taşıyıcı nanoemülsiyon | Soya lesitin ve distile su | Yüksek hızlı homojenizatör |
| Norkantridin | Taşıyıcı nanoemülsiyon | Triasetin, Kremofor EL ve butanol | Kendiliğinden emülsifikasyon |
| Fluvastatin | Hidrojel | Karbopol 940 | Sulu faz titrasyon |
| Isıya duyarlı nanoemülsiyon | Hidrojel | İzopropil miristat, Tween 80, Span 80 ve Pluronic | Jelasyon |
| Hidrokortizon | Nanoemüljel | Palm yağı, Tween 80, propilen glikol | Kendiliğinden emülsifikasyon |
| <i>Glycyrrhiza glabra</i> ekstresi | Jel | Tween, izopropil alkol ve izopropil miristat | |

Azhar ve Salim’in (2018) yapmış olduğu bir çalışmada, cilt beyazlatıcı amaçla kullanım için kojik monooleat bileşiğinin su içinde yağ formunda nanoemülsiyonları hazırlanmış ve *in vitro* değerlendirmesi yapılmıştır. Hint yağı, limon esansiyel yağı, Tween 80 ve ksantan zamkı kullanılarak, ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanan kojik monooleat nanoemülsiyonlarının 110 nm damlacık büyüklüğünde elde edildiği belirtilmiştir. Çalışmada topikal ürünün sitotoksikite değerlendirmeleri ve fiziksel stabilitesi uygun bulunmuştur. Yağ içinde su tipinde nanoemülsiyonların cilt beyazlatıcı etkinliğinin nano boyuttaki damlacıkların cilde daha iyi penetrasyon göstermesinden dolayı artabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Kojik monooleatın nanoemülsiyonlarının hazırlandığı bir başka çalışmada ise, yüksek hızlı karıştırıcı kullanılarak nanoemülsiyonlar 103,97 nm damlacık büyüklüğünde elde edilmiştir (Roselan ve diğerleri, 2020). Yağ içinde su tipi nanoemülsiyonların sitotoksik etki göstermediği ve *in vitro* TYR aktivitesinin nano boyutun getirdiği üstünlükler ile artırıldığı bulunmuştur.

α -Mangostin ve α -kojik asitin kombine kullanımında su içinde yağ içinde su nanoemülsiyon formülasyonları yüksek enerjili yöntem kullanılarak hazırlanmıştır. Span 80 ve ksantan zamkı ile stabilize edilen nanoemülsiyonlar 195,9 nm boyutunda ve uzun dönem fiziksel olarak stabil krem formülasyonları olarak elde edilebilmiştir (Yin ve diğerleri, 2024). Silva ve arkadaşları (2023) kersetin-yüklenmiş zeytinyağı nanoemülsiyonlarını, kersetinin düşük sudaki çözünürlüğünden kaynaklanan düşük deri penetrasyonu sorunlarını ortadan kaldırmak için geliştirmişlerdir. Yüksek enerjili nanoemülsifikasyon ile hazırlanan formülasyonlar 183,43 nm damlacık büyüklüğünde elde edilebilmiştir. Kersetin-zeytinyağı nanoemülsiyonlarının yüksek düzeyde antioksidan aktivite ve TYR inhibisyonu gösterdiği *in vitro* çalışmalar ile rapor edilmiştir. Nanoemülsiyonların hipermelanoz için ve deri hiperpigmentasyonunu azaltmak üzere potansiyel oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Etkili bir cilt rengi açıcı serum geliştirmek için zeaksantin gibi bitkisel kaynaklı antioksidanlar içeren nanoemülsiyonların kullanılması ile ilgili literatürde araştırmalar bulunmaktadır (Setiawan ve diğerleri, 2022). Bu nanoemülsiyonlar, karotenoit antioksidanların topikal kullanımdaki etkinliğini ve cilt beyazlatma etkinliğini artırmak üzere tasarlanmıştır. *Tamarindus indica* meyve ekstresinden elde edilen fenolik asitler gibi biyoaktif fitobileşen-yüklü nanoemülsiyonların cilt rengini açıcı ve antioksidan özelliklere sahip olduğu ve bu özelliklerin cildin görünümünü iyileştirmek üzere umut vaad ettiği belirtilmektedir (Romes ve diğerleri, 2021).

Topikal nanoemülsiyonlar ile ilgili çalışmalar, özellikle su içinde yağ tipindeki nanoemülsiyonların *in vitro* ve *in vivo* değerlendirmelerine dayanarak cilt beyazlatıcı ajanlar için formüle edilerek topikal uygulaması için potansiyel araçlar olarak tanımlandığını göstermiştir (Rocha-Filho ve diğerleri, 2017).

Cilt beyazlatıcı ürünlerde kullanılan bileşikler ve nanoemülsiyon formülasyonları ile ilişkili potansiyel advers etki riskleri de göz önüne alınmalıdır. Örneğin, civa, hidrokinon ve topikal kortikosteroid içeren cilt rengi açıcı ürünler sistemik ve kutanöz komplikasyonlarla ilişkilidir ve bunun gibi toksik etki gösterebilecek bileşiklerin seviyelerinin düzenlenmesini ve kullanılan bileşiklerin sitotoksitesi, nefrotoksitesi ve genotoksitesi göz önüne alarak kapsamlı güvenlik değerlendirmelerinin yapılmasını gerekli kılmaktadır (Sommerlad, 2021; Mahé ve diğerleri 2003; Zota & Shamasunder, 2017; Ricketts ve diğerleri, 2020).

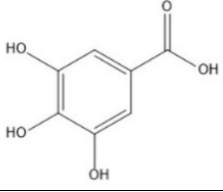
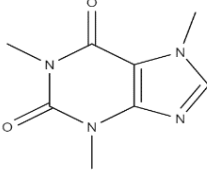
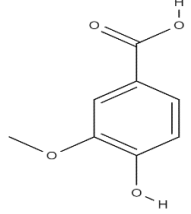
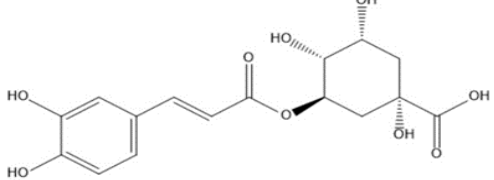
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

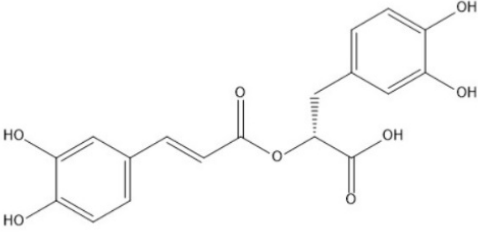
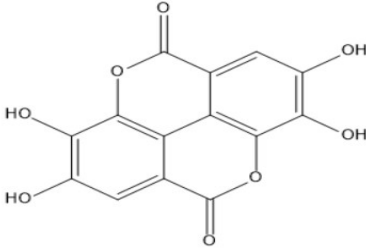
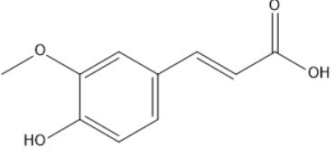
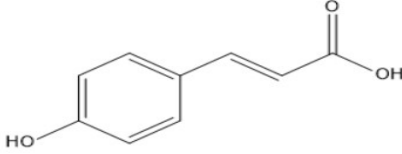
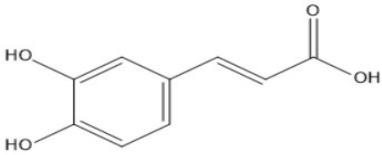
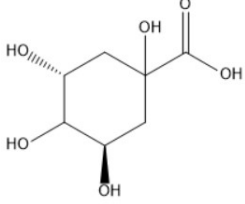
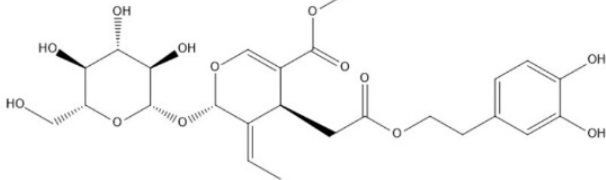
Tez çalışmamızda, bitkilerde yaygın olarak bulunduğu tespit edilen farklı kimyasal gruplardan 36 adet fenolik bileşik ile referans maddeler Sigma-Aldrich firmasının (St. Louis, Missouri, ABD) Türkiye temsilcisi firmalardan temin edilmiştir.

Tez gereçlerimizi oluşturan fenolik bileşiklerin isimleri, kimyasal yapıları ve kimyasal sınıfları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

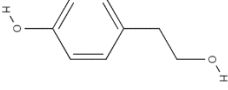
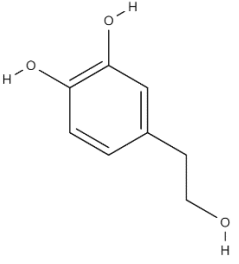
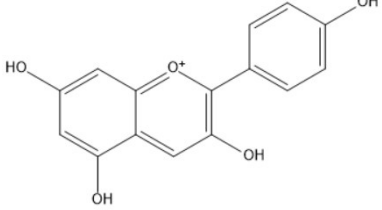
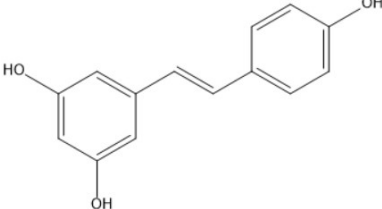
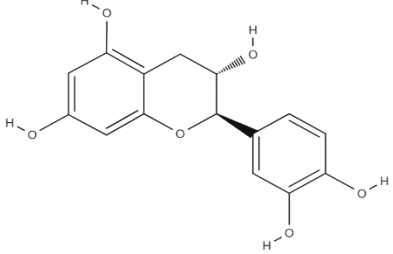
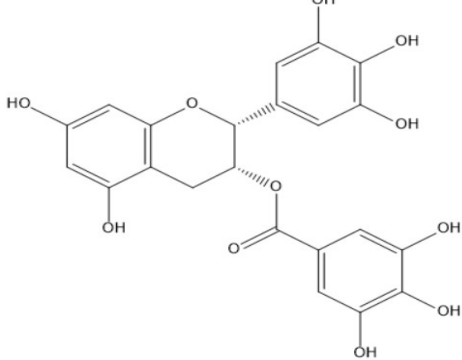
Çizelge 3.1. Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

| Fenolik Bileşikler | Kimyasal Yapı | Kimyasal Sınıf |
|--------------------|--|----------------------|
| Gallik asit |  | |
| Sirinjik Asit |  | Hidroksibenzoik asit |
| Vanilik asit |  | |
| Klorojenik asit |  | Kafeik asit esteri |

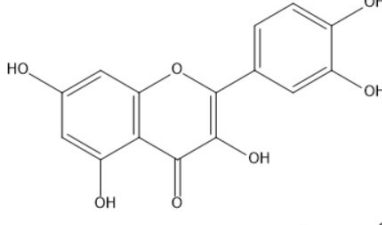
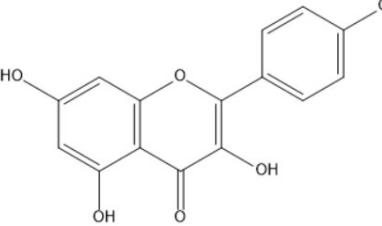
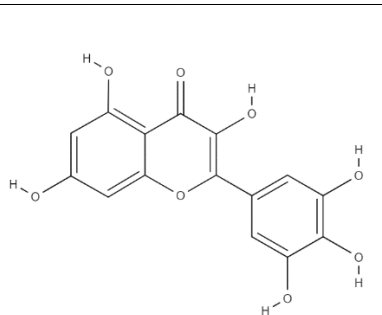
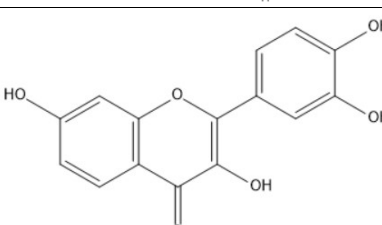
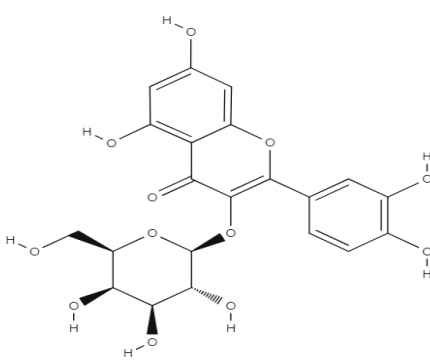
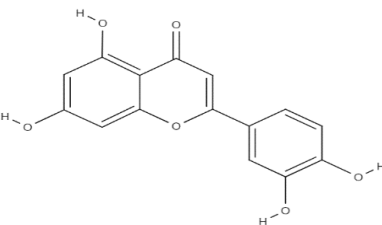
Çizelge 3.1. (devamı) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

| | | |
|----------------------------|--|------------------------------|
| Rozmarinik asit |  | |
| Elajik asit |  | Gallik asitin dimerik türevi |
| <i>Trans</i> -Ferulik asit |  | |
| <i>p</i> -Kumarik asit |  | Hidroksisinnamik asit |
| Kafeik asit |  | |
| D-(-)-Kinik asit |  | Sikloheksan karboksilik asit |
| Oleuropein |  | Sekoiridoit glikozit |

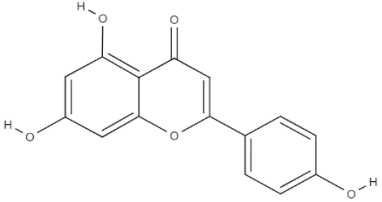
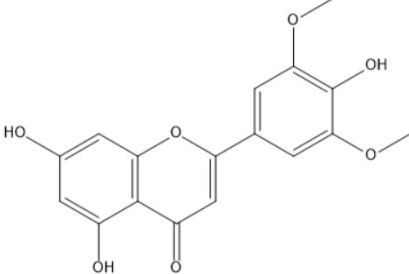
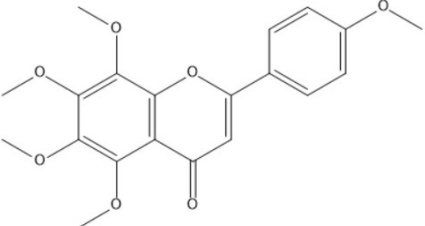
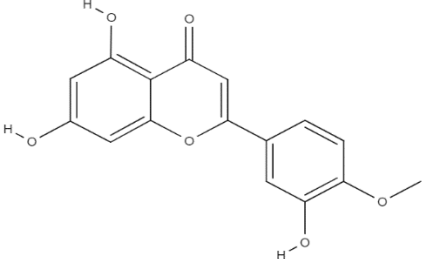
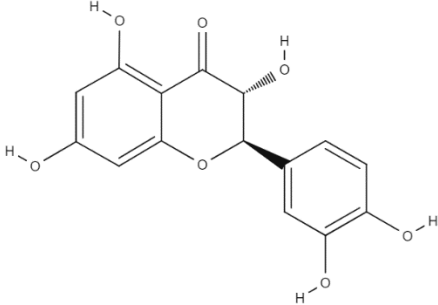
Çizelge 3.1. (devamı) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

| | | |
|-------------------|--|---------------|
| <i>p</i> -Tirozol |  | |
| Hidroksitirozol |  | Fenetil alkol |
| Pelargonidin |  | Antosiyanidin |
| Resveratrol |  | Stilben |
| Kateşin |  | |
| EGCG |  | Flavan-3-ol |

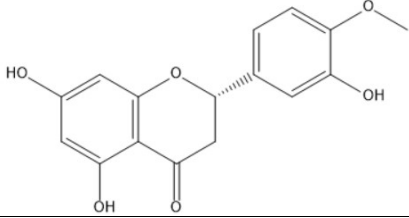
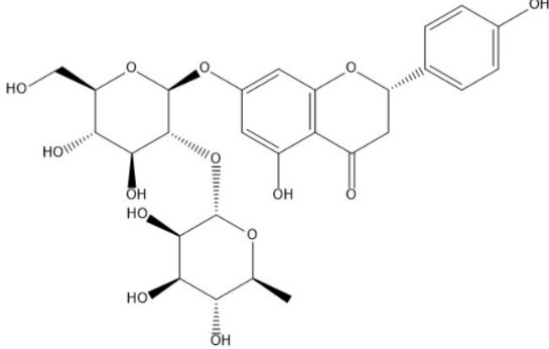
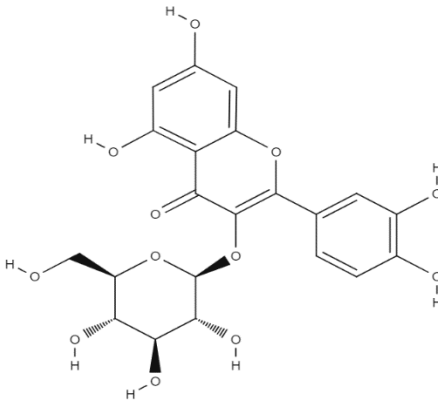
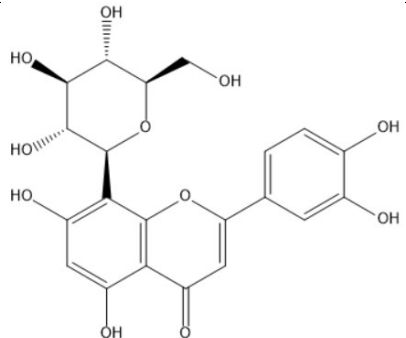
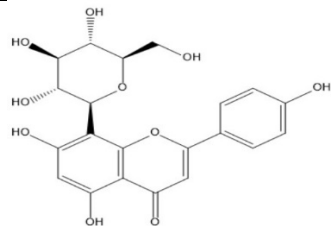
Çizelge 3.1. (devamı) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

| | | |
|-----------|---|----------|
| Kersetin |  | Flavonol |
| Kemferol |  | |
| Mirisetin |  | |
| Fisetin |  | |
| Hiperozit |  | |
| Luteolin |  | Flavon |

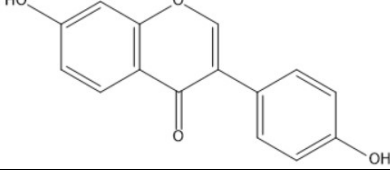
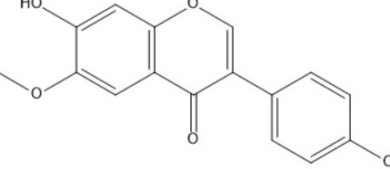
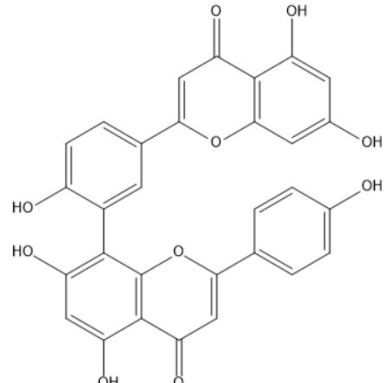
Çizelge 3.1. (devamı) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

| | | |
|------------|---|------------|
| Apigenin |  | |
| Trisin |  | |
| Tangeretin |  | |
| Diosmetin |  | |
| Taksifolin |  | Flavanonol |

Çizelge 3.1. (devamı) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

| | | |
|--------------|---|-----------------------|
| Hesperetin |  | Flavanon |
| Naringin |  | Flavanon 7-O-glikozit |
| İzokersitrin |  | Flavanon 3-O-glikozit |
| Orientin |  | Flavon-8-C-glikozit |
| Viteksin |  | |

Çizelge 3.1. (devamı) Tez çalışması için seçilen bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin kimyasal yapı ve sınıfları

| | | |
|--------------|--|-------------|
| Daidzein |  | İzoflavon |
| Glisitein |  | |
| Amentoflavon |  | Biflavonoit |

3.2. Yöntemler

3.2.1. TYR inhibisyonu tayini

TYR inhibisyonu Lee ve diğerleri (2019) ile Senol (2016) tarafından modifiye edilen spektrofotometrik bir yöntemle tayin edilmiştir. L-DOPA'nın (Sigma, ABD) substrat olarak kullanıldığı yöntemin esası, substratın enzim ile reaksiyonu sonucu oluşan dopakromun absorbansının 492 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. Öncelikle, 96 kuyucuklu mikroyağa 10 µL örnek çözeltisi veya dimetilsülfoksit (DMSO) eklenmiştir, ardından 80 µL 67 mM fosfat tamponu (pH 6,8) ve 30 µL 5 mM L-DOPA ilave edilmiştir. Mikroyağ 37°C'de 10 dk inkübe edilerek, 30 µL mantar kaynaklı TYR (EC 1.14.18.1, Sigma) enzim solüsyonu kuyucuklara eklenmiştir. Akabinde 20 dk daha inkübasyondan sonra, absorbans 492 nm'de ELISA mikroyağ okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) ölçülmüştür. Referans madde olarak α -kojik asit (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Örneklerin % TYR inhibisyonları aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 paralel deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması \pm standart sapma (S.S.) olarak verilmiştir.

% İnhibitör etki aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

3.2.2. Elastaz inhibisyonu tayini

Tez gereçlerini oluşturan fenolik bileşiklerin elastaz inhibisyonu Kraunsoe ve diğerlerinin, Lee ve diğerleri tarafından modifiye edilmiş spektrofotometrik yöntemi kullanılarak test edilmiştir (Kraunsoe, Claridge ve Lowe, 1996; S. H. Lee ve diğerleri, 2009; Senol, 2016). Enzim kaynağı olarak domuz pankreatik elastazı (Tip IV, Sigma, EC 3.4.21.36), substrat olarak ise *N*-Suc-(Ala)₃-*p*-nitroanilit (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Yöntemin esası, substrattan salınan nitroanilin 410 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. Substrat (1,015 mM), Tris-Cl (0,1 M, pH 8,0) tamponunda hazırlanmış ve bu çözelti (130 µL) DMSO'da çözülen örnekler (10 µL) ile 96 kuyucuklu mikropakta karıştırılmıştır. Mikropak 25 C°'de 5 dk ön-inkübasyona bırakıldıktan sonra 0,5 ünite/mL (15 µL) enzim solüsyonu eklenmiştir. Enzim eklendikten sonra mikropak 25°C'de 30 dk inkübe edilmiş ve substrattan salınan *p*-nitroanilin miktarı 410 nm'de ELISA mikropak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Referans olarak *N*-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chloromethyl ketone (PVC) , kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin % elastaz inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 410 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 410 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

3.2.3. Kolajenaz inhibisyonu tayini

Kolajenaz inhibisyonu Wart ve Steinbrink tarafından geliştirilen, modifiye edilmiş spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçülmüştür (Barrantes ve Guinea, 2003; Van Wart ve Steinbrink, 1981; Senol, 2016). Enzim kaynağı olarak *Clostridium histolyticum*

kolajenazı (Sigma, EC 3.4.23.3) kullanılırken, substrat olarak *N*-(3-[2-furil]akriloil)-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) (Sigma, ABD) kullanılmıştır. 0,8 ünite/mL enzim 50 mM trisin tamponunda (10 mM CaCl₂ ve 400 mM NaCl ile pH 7,5) çözülmüştür. Substrat FALGPA 2 mM olacak şekilde aynı tamponda çözülmüştür. 25 µL tampon, 25 µL DMSO veya örnek ve 25 µL enzim 96 kuyucuklu mikropalak kuyucuğunda karıştırılmıştır. 15 dk ön-inkübasyondan sonra 50 µL substrat eklenmiştir. Absorbans 340 nm'de 20 dk boyunca 2 dk aralıkla ELISA mikropalak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Referans olarak 1,10 fenantrolin, kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin % kolajenaz inhibisyonları aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 340 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 340 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

3.2.4. XO inhibisyonu tayini

XO inhibisyonu yöntemi, enzim reaksiyonu sonucunda oluşan ürik asitin absorbansının 295 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Khan ve diğerleri, 2006; Senol, 2016). 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,5), 10 µL dimetilsülfoksit (DMSO) veya fenolik bileşikler ve 20 µL enzim (0,003 ünite/kuyucuk) 96 kuyucuklu mikropalak kuyucuğunda karıştırılmıştır. 10 dk ön-inkübasyondan sonra substrat olarak 20 µL ksantin (0,1 mM) eklenerek reaksiyon başlatılmış ve absorbans değişimi 10 dk boyunca ELISA mikropalak okuyucuda (Spectramax tunable microplate reader, ABD) 295 nm'de ölçülmüştür. Referans olarak allopurinol, kontrol olarak ise DMSO kullanılmıştır. Örneklerin % XO inhibisyonları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - [(A_1 / A_2) \times 100]$$

A₁= Örnek çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂= Kontrol çözeltilerinin 492 nm dalga boyundaki ortalama absorbansı

3.2.5. Antioksidan aktivite testleri

Bakır-indirgeme antioksidan gücü (CUPRAC) tayini

Tez gereçlerini oluşturan fenolik bileşiklerin CUPRAC tayin etmek amacıyla, esası bakır-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc) antioksidan etkili maddeler ile Cu(I)-Nc'e redüksiyonuna dayanan Apak ve diğerleri (2004) ile Senol (2016) yöntemi esas alınarak uygulanmıştır. Bunun için 25 µL 10 mM bakır (II) klorür, 25 µL 7,5 mM neokuproin, 25 µL 1 M amonyum asetat (pH 7), 25 µL örnek ve 100 µL distile su 96 kuyucuklu mikropalak kuyucuğunda karıştırılmıştır. Daha sonra mikropalak 30 dk inkübe edilerek, süre sonunda absorbanslar 450 nm dalga boyunda ELISA mikropalak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış, sonuçlar 3 paralel deneyden elde edilen absorbansların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir. Referans madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Sonuçlar, artan absorbans değerlerinin indirgeme gücünün arttığına işaret etmesi şeklinde değerlendirilmiştir.

DPPH yöntemi ile radikal süpürücü etki tayini

Örneklerin DPPH radikaline karşı süpürücü etkileri, koyu-viyole renkten açık-sarı renge dönüşümün UV/görünür bölgede 515 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edilmiştir. Yönteme göre (Nenadis ve Tsimidou, 2002), 0,138 mg/mL DPPH solüsyonu ölçümlerden hemen önce taze olarak hazırlanmıştır ve örnek çözeltilerinden 10 µL alınarak 96 kuyucuklu mikropalağa konulmuştur, üzerlerine 90'ar µL DPPH solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra örnek ve DPPH solüsyonları, karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek inkübe edilmiştir. Kontrol olarak etanol kullanılmış ve tüm solüsyonların absorbansları 515 nm'de ELISA mikropalak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Tüm örnekler için deney 3 paralel olarak uygulanmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen % inhibisyonların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir. Referans bileşik olarak kersetin kullanılmıştır. % Süpürücü etki ise şu formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Süpürücü etki} = [(A_1 - A_2) / A_1] \times 100$$

A₁ = DPPH stok solüsyonunun 515 nm dalga boyundaki absorbansı

A₂ = Örnek solüsyonunun 515 nm dalga boyundaki absorbansı

Demir-İndirgeme Antioksidan Gücü Tayini (FRAP)

Örneklerin demir-indirgeme antioksidan gücü (ferric-reducing antioxidant power, FRAP), bazı modifikasyonlar ile Oyaizu (1986) ile Senol (2016) yöntemi esas alınarak Ferreira, Baptista, Vilas-Boas ve Barros'un (2007) yöntemine göre tayin edilmiştir. Yönteme göre; örnek çözeltilerinden 10 µL alınarak, 0,2 M pH değeri 6,6 olan 25 µL fosfat tamponu ve 25 µL potasyum ferrisiyanür ilave edilmiş, elde edilen karışım 50°C'de 20 dk ön-inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 25 µL % 10 trikloroasetik asit (TCA, Sigma) eklenmiştir. Daha sonra üzerine 85 µL distile su ve 17 µL demir-III-klorür eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk daha inkübasyona bırakıldıktan sonra, absorbanslar 700 nm dalga boyunda ELISA mikropalak okuyucuda (Versamax tunable microplate reader, ABD) okutulmuştur. Her örnek 3 paralel olarak çalışılmış ve sonuçlar 3 deneyden elde edilen absorbansların ortalaması ± S.S. olarak verilmiştir. Referans bileşik olarak kersetin kullanılmıştır. Sonuçlar, artan absorbans değerlerinin indirgeme gücünün arttığına işaret etmesi şeklinde yorumlanmaktadır.

3.2.6. Moleküler kenetlenme deneyleri

Moleküler kenetlenme çalışmaları, tez materyallerini teşkil eden fenolik bileşiklerden TYR'a karşı en etkili inhibitörler üzerinde Schrödinger Small-Molecule Drug Discovery Suite 2018-1 (Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019) gerçekleştirilmiştir. Oksipurinol bağlı bovin ksantin dehidrogenaz (XDH; PDB kodu: 3BDJ) yapısı RCSB Protein Data Bank (PDB) veri tabanından indirilmiş, Schrödinger programının Protein Preparation Wizard modülü kullanılarak hazırlanmıştır (Okamoto, Eger, Nishino, Pai ve Nishino, 2008). Hazırlık aşamasında aktif bölgedeki kristal su molekülleri silinmiş, hidrojen atomları eklenmiş, eksik veya yanlış atom tipleri düzeltilmiştir. Sıvı simülasyonları için optimize edilmiş potansiyel (optimized potential for liquid simulations, OPLS-3) kuvvet alanı uygulanarak kök-ortalama-kare sapması (root-mean-square deviation, RMSD) değeri en fazla 0,3 Å olacak şekilde enerji minimizasyonu yapılmıştır. Enzim X-ışını kristal yapısına bağlı inhibitör molekül seçilerek, inhibitörün çevresinde aktif bölgeyi koordinatlarıyla tanımlayan 20 Å'luk bir kutu (grid), "receptor grid generation" paneli ile oluşturulmuştur. Bu aşamada kuvvet alanı olarak yine OPLS-3 kullanılmış, Van der Waals ölçeklendirme faktörü 1,00 ve yük parçalı kesme noktası 0,25 olarak tanımlanmıştır. Elde edilen reseptör grid dosyaları moleküler doklama çalışmasında kullanılmak üzere kaydedilmiştir. Moleküler

kenetlenme çalışması için seçilen bileşikler, Schrödinger programının Maestro ara yüzünde çizilmiş ve LigPrep (Schrödinger Release 2018-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018) modülü ile varsayılan değerler kullanılarak 3 boyutlu yapıları hazırlanmıştır. Moleküller önceden kaydedilen grid dosyası üzerinden Schrödinger programının Glide modülü ile enzim aktif bölgesine Extra Precision (XP) algoritması kullanılarak yerleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar GlideScore değerleri temel alınarak incelenip, moleküllere ait uygun bağlantı modları belirlenmiştir.

3.2.7. Sitotoksisite testi

Hücre kültürü

Hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonundan (American Type Culture Collection, ATCC) temin edilmiştir. Antimelanojenik etki için SKMEL-3 insan malignant melanoma hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, tipine özgü zenginleştirilmiş besi yerlerinde 37°C'de % 5 CO₂ içeren inkübatörde T25 veya T75 erlenlerde kültüre edilmiştir. Bütün deneylerde büyüme fazındaki hücreler kullanılmıştır. Hücreler yeterli konfluent düzeyine ulaştığında, hücreler deneye alınmadan önce tripan mavisi metodu ile canlı hücre sayımı yapılmıştır.

Sitotoksisite deneyi

Sitotoksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik test yöntemlerinden biri olan 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde görülmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilmektedir.

MTT yönteminde 96 kuyucuklu plakalarda her bir kuyucuğa 5000 hücre ekilmiştir. Hücre yoğunluğu %70-80 olduktan sonra hücrelerin besi yeri fenol kırmızısı içermeyen besi yeri ile değiştirilmiş deney tasarımına göre artan konsantrasyonlarda madde uygulamaları yapılmıştır. Sadece besi yeri ve çözücü içeren kontrol grupları da deney tasarımına eklenmiştir. Bu hücreler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. 72

saatin sonunda hücrelerin üzerindeki besi yeri uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır. Her bir çukura 200 µl fenol kırmızı içermeyen taze besiyeri ve 50 µl 1g/L konsantrasyondaki MTT çözeltisi eklenmiştir. Ardından hücreler 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası çukurlardaki karışım uzaklaştırılmış ve her çukura DMSO ilave edilmiştir. Formazan kristallerinin çözülmesi için çalkalayıcıda 10 dk bekletilmiştir. Plak okuyucuda 570 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür. Sitotoksik aktivite deneyi her örnek için en az 2 kez, her seferinde 3'lü tekrarlar olarak çalışılmış ve bileşiklerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

3.2.8. Kozmetik formülasyon geliştirme çalışmaları

Formülasyon Geliştirilmesi

En etkili kombinasyon olarak belirlediğimiz kersetin ve fisetin (1:1) kombinasyonu içeren nanoemülsiyonun hazırlanmasında spontan emülsifikasyon yöntemi kullanılmıştır. Önce yağ fazı (hint yağı) ve su fazı (Tween 80, PEG 400 ve distile su) karıştırılarak 60 – 65 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Yüksek hızlı homojenizatör (Silent Crusher M, Heidolph, Almanya) ile 25 000 rpm'de 1 dk homojenize edilmiştir. Kaba emülsiyon, %75 amplitude (genlik) değerinde 5 dk boyunca ultrasonike (Bandelin, Sonopuls 2070, Almanya) edilmiştir. Oda sıcaklığına gelen nanoemülsiyonlar vidalı kapaklı viallere alınarak karakterizasyon çalışmaları için saklanmıştır.

Nanoemülsiyonların oluşumunda kritik kontrol parametreleri olarak damlacık boyutu (droplet size, DS) ve polidispersite indeksi (polydispersity index, PDI) değerleri dikkate alınarak formülasyon parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda formülasyon parametreleri olarak farklı oranlarda yağ fazı ve su fazı tasarım alanı olarak belirlenmiş ve 2³ faktörlü tasarım kullanılmıştır (Design Expert® v12). Hint yağı (%5, %10), Tween 80 (%2,5, %5) ve polietilen glikol 400 (PEG 400, %2,5, %5) bağımsız değişkenlerinin bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Faktörler arası etkileşimlerin analizi için full faktöriyel desen kullanılarak, her deney 3 kez tekrarlanmış ve toplam 24 adet deney gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon parametrelerine göre belirlenen oranlarda değişkenler kullanılarak sonuç preparat hazırlanmıştır. Fisetin ve kersetin (%3, a/a) kombinasyonu 1:1 oranında yağ fazında eritilmiş ve diğer prosedürler aynen takip edilmiştir. Metil selüloz (%2,5) içeren jel içerisinde emülsiyonlar dispersiyon haline getirilmiştir.

3.2.9. Nanoemüljel formülasyonunun cilt üzerine etkilerinin test edilmesi

Laboratuvarımızda prototip formülasyonları test etme imkânımız olmadığından, fisetin ve kersetin kombinasyonunu (%3, a/a) 1:1 oranında içeren nanoemüljel formülasyonumuzun cilt üzerine etkileri 2 boyutlu (two dimensional, 2D) ve 3 boyutlu (three dimensional, 3D) deney modellerinde, Avusturya İlaç Araştırma Enstitüsü (Austrian Drug Screening Institute, ADSI) kozmetik laboratuvarlarında test edilmiştir. Bu amaçla örnek taraması için ADSI tarafından geliştirilen hücre-bazlı deneylerin gerçekleştirilmesine yönelik otomize edilmiş test platformu (automated screening assay platform, ASAP) uygulanmaktadır.

2D hücre testleri

Hücre canlılık testi

Nanoemüljel formülasyonumuz HaCaT keratinosit modeli ile canlılık testine tabi tutulmuştur. Bu amaçla, HaCaT Luc4-NF- κ B raportör hücre hattı enflamasyon ve canlılık deneyleri için kullanılmıştır. Uygulamadan 2 gün önce, tedavi için konfluent bir hücre tabakası elde etmek üzere kuyucuk başına 17.000 hücre ekilmiştir. Ertesi gün, kültür ortamı deney ortamı ile değiştirilmiştir. Üçüncü gün NF- κ B aktivasyonu 4 saat boyunca örneklerin varlığında 0,75 ng/ml TNF- α kullanılarak sağlanmıştır. Hücreler parçalanmadan 2 saat önce resazurin eklenmiş ve deney gerçekleştirilmiştir. TNF- α indüksiyonundan 6 saat sonra, hücreler 1x PBS ile yıkanmış, 40 μ l soğuk lizis tamponu (250 mM Tris-HCl, pH: 7.5, %2 Triton X-100) ile 3 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa 150 μ l deney tamponu (25 mM glisilglisin, pH: 7.8, 5 mM ATP ve 15 mM MgSO₄) eklenmiştir. Luminesans sinyali enjektörlü bir plaka okuyucu (Tecan Spark) ile ölçülmüştür. Her bir kuyucuğa 50 μ l enjeksiyon tamponu (25 mM glisilglisin, pH: 7.8, 50 μ M lusiferin) enjekte edilmiş ve plak okuyucuda luminesans sinyali 3 saniye boyunca ölçülmüştür.

Resazurin/ canlılık testi

Nanoemüljel formülasyonumuzun sitotoksik potansiyelini başka bir test modelinde araştırmak üzere resazurin deneyi de uygulanmıştır. Resazurin, canlı hücreler tarafından resorufine indirgenir ve bu indirgenme floresan ölçümleriyle tayin edilmektedir (Ext. 560 nm, Em. 590 nm). Sitotoksik maddeler hücrelerin metabolik aktivitesini azaltarak resazurin

döngünün yavaşlamasına ve dolayısıyla kültürün metabolik aktivitesiyle orantılı olan floresan sinyalinin azalmasına neden olur. Canlılık testleri için HaCaT hücrelerinin NF- κ B metabolik aktivitesi, nanoemüljel formülasyonumuzun uygulanmasından 4 saat sonra belirlenmiştir. Anti-enflamatuvar test için, TNF- α ile indüksiyondan 4 saat sonra resazurin deneyi yapılmıştır. Her bir deney için, hücreler numune ile aynı zamanda ölçümden 2 saat önce 0,015 mg/ml resazurin ile muamele edilmiştir. Tüm deneyler teknik 3 paralel olarak gerçekleştirilmiştir.

Anti-enflamatuvar etki testi

Sitotoksik potansiyelin araştırılması için tamamlayıcı bir yöntem olarak lusiferaz deneyi gerçekleştirilmiştir. Lusiferaz, bunları ifade eden organizmaların ışık yaymasını sağlayan bir oksidatif enzim sınıfıdır. Lusiferaz raportör geni, ATP, oksijen ve Mg^{++} varlığında D-lusiferini oksitleyen 61-kDa'lık bir enzimi kodlamakta ve açığa çıkan ışığın ölçülmesiyle miktarı tayin edilebilen floresan bir ürün vermektedir (Smale ve diğerleri, 2010). Nanoemüljel formülasyonumuzun lusiferaz aktivitesi, ADSI kozmetik laboratuvarında luminometre (Tecan Group Ltd., Mannedorf, İsviçre) ile ölçülmüştür.

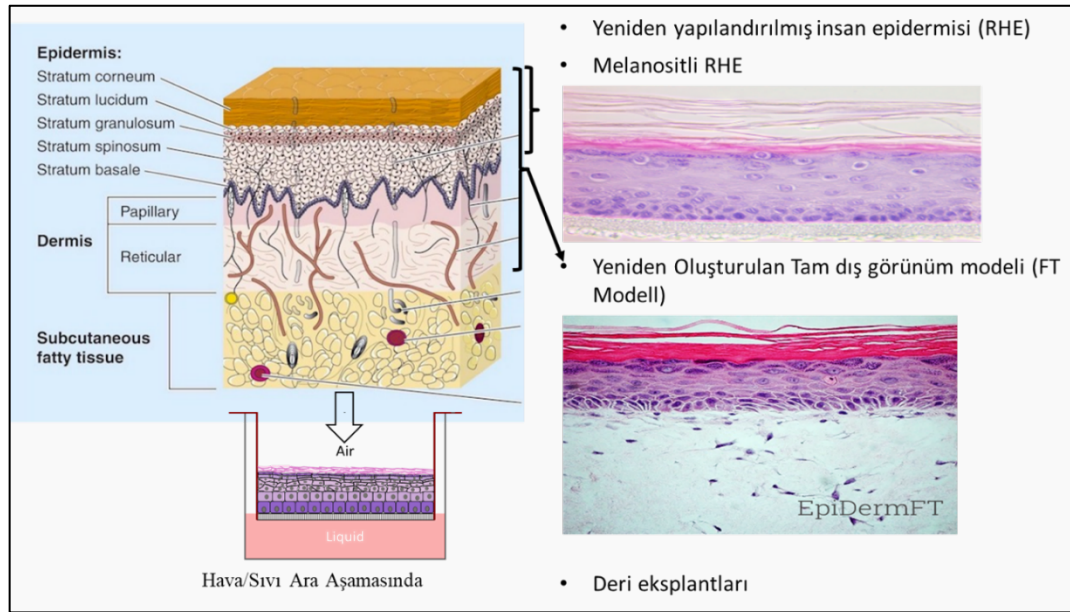
3D Hücre testleri

ADSI kozmetik laboratuvarında melanosit taşıyan yeniden yapılandırılmış insan epidermisi (reconstructed human epidermis, RHE) elde edilmiştir. Yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE) modelleri, dermal akut toksisite için *in vitro* test yöntemlerinde kullanılmaktadır (OECD, 2013b; OECD, 2014b).

MTT testi

Hücre canlılığı, canlı hücrelerin laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesine dayanan MTT indirgeme testi kullanılarak ölçülmüştür (Mosmann, 1983). Sarı renkli MTT halkası dehidrojenazlar tarafından parçalanarak kültür ortamında çözünmeyen mavi/mor formazan kristalleri oluşturur. Doku sağlıklı olduğunda yoğun bir mor renk gözlenirken, nekroz meydana geldiğinde kültür beyaz renkte kalmaktadır. Tüm test koşullarının her maruz kalma süresi için (3 dk ve 60 ± 5 dk), kontrol veya kimyasal başına 3 RHE doku örneği kullanılmıştır. 40 μ l (40 IL \pm 3 IL; 80 IL/cm²) sıvı veya viskoz kimyasal uygulanmıştır.

Homojen bir yayılma elde etmek için tüm yüzeye bir naylon ağ uygulanmıştır. Katı veya yapışkan kimyasal durumunda, RHE doku örneğinin tüm yüzeyine $20 \text{ IL} \pm 2 \text{ IL}$ su yayılmıştır. Ardından $20 \pm 3 \text{ mg}$ (40 mg/cm^2) katı kimyasal uygulanmıştır. Test bileşikleri EpiCS® TNF- α (25 ng/ml) içeren ortama konmuş ve 6 saat boyunca üstten (hava arayüzü) muamele edilmiştir. Böylece 6 saat sonra numune Dulbecco fosfat tamponlu tuzlu su (Dulbecco's phosphate-buffered saline, DPBS) ile yıkanmış ve hücreler TNF ortamı ile yeni bir kuyucuğa aktarılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra, hücrelerin saklandığı ortamdan alikot alınmıştır. Daha sonra taze besiyeri (TNF içermeyen) içeren yeni bir kuyu plakası yapılmış ve hücreler aktarılmıştır. 24 saat sonra sitokin analizleri için ortamdan bir alikot daha alınmıştır. Daha sonra metabolik aktiviteyi tayin etmek için hala yaşayan epiklerden bir MTT yapılmıştır.



Şekil 3.1. *In vitro* 3D cilt modelleri

Korozyon testi

SkinEthic™ RHE test yöntemi, aşındırıcı ve aşındırıcı olmayan kimyasalları ayırt etmek için OECD TG 431 kapsamında kabul edilmiştir. Bu modeller insan kaynaklı epidermal keratinositlerle oluşturulur ve epidermin tipik çok katmanlı hücre organizasyonunu yeniden üreten 3D bir yapı oluşturur ve farklı uygulamalar için kullanılmaktadırlar. Bunlardan biri, OECD Test Kılavuzu (TG) No. 431'de (OECD, 2014b) açıklandığı gibi potansiyel cilt aşındırıcı kimyasalların değerlendirilmesi için cilt korozyon testidir (skin

corrosion test, SCT). Deri korozyonu, “bir test kimyasalının uygulanmasını takiben deride geri dönüşü olmayan hasar” olarak tanımlanmaktadır (UN, 2013). Klinik olarak, kimyasala maruz kalmayı takiben epidermis ve dermis boyunca nekroz gözlenir. OECD Cilt Korozyonu ve Tahrişi Uzman Paneli tarafından, RHE modellerinin (OECD TG 431) cildi aşındırıcı alt kategorileri belirlemek ve özellikle AB CLP ve BM GHS sınıflandırma sisteminde tanımlandığı üzere alt kategori 1A ile alt kategori 1B ve 1C arasında ayırım yapmak için kullanışlılığını değerlendirmek üzere 82 maddeden oluşan bir set belirlenmiştir. Madde seti, ECVAM cilt doğrulama çalışmalarında orijinal olarak kullanılan maddeleri, 12 orijinal OECD referans maddesini (OECD TG 431, 2004) ve OECD uzman paneli tarafından tanımlanan yeni maddeleri içermektedir. Seçim, *in vivo* BM GHS/AB CLP sınıflandırmalarına dayandırılmış ve net sınıflandırmaları olmayan maddeler dikkate alınmamıştır. Tez kapsamında geliştirilen nanoemüljel formülasyonumuz KOH ile muamele edilmiştir.

Sitokin testi

Nanoemüljel formülasyonumuzun cilt rejenerasyonu sağlayıcı ve ciltteki enflamasyona karşı etkisi bir dizi sitokin ve kemokine karşı test edilmiştir (Tablo 1). Bu amaçla xMAP Technology Luminex kullanılmıştır. Luminex xMap teknolojisi, mikroplak formatında boncuk tabanlı çoklanmış bir immünoassay sistemidir. Sistem, sistem tasarımına bağlı olarak tek bir numunede 500'e kadar birçok hedefi aynı anda tespit edebilir. Luminex sisteminde kullanılan mikroküreler farklı spektral adreslere (renk kodları) sahiptir. Bu benzersiz spektral adresler, xMAP teknolojisinde boncukların biri kırmızı dalga boyunda, diğeri uzak kırmızıda olmak üzere farklı oranlarda iki floroforla dahili olarak etiketlenmesiyle oluşturulur. İstenen hedeflere özgü antikorlar, ligantlar ve nükleik asitler dahil olmak üzere proteinler boncuklara bağlanabilir. Luminex teknolojisine sahip Bio-Plex sistemleri, çoklu biyobelirteçlerin yukarı ve aşağı regülasyonunun gerçek zamanlı olarak hızlı, doğru ve esnek bir şekilde ölçülmesini sağlar. Bio-Plex Pro™ testleri, hücre sinyalizasyonu, sitokinler, kanser, diyabet ve anjiyogenez dahil olmak üzere çok çeşitli çalışmalar için kitler mevcuttur. Testler önceden karıştırılmış paneller, özel karışımlar (Bio-Plex Assay Builder tarafından tasarlanmış) veya singleplex setler olarak sunulmaktadır.

Luminex sisteminin kullanıldığı bir tahlilde, boncuklar formülasyonumuz ile inkübe edilmiştir. Yıkamadan sonra, boncuklar tüm hedeflere karşı biyotinlenmiş antikorların bir

karışımı ile inkübe edilmiştir. Akabindeki yıkamadan sonra, boncuklar raportör streptavidin-PE ile inkübe edilmiştir. Numunede bulunan hedefler için, bağlı hedefe özgü antikor + hedef + biyotinlenmiş hedefe özgü antikor + streptavidin raportörü ile boncuktan oluşan bir kombinasyon oluşturulmuştur. Çift lazer sistemi kullanılarak her bir boncuğun imzası tanımlanmıştır ve boncukla ilişkili raportörün varlığı ve yoğunluğu eş zamanlı olarak tespit edilmiştir. Bu, hedef sitokin/kemtokinlerin teşhisi ve miktarı hakkında bilgi vermektedir.

4. BULGULAR

4.1. TYR İnhibisyonuna Ait Bulgular

Tez çalışmalarımızda kullanılan 36 adet fenolik bileşimin TYR inhibitör aktivitesi test edilmiştir. Bileşiklerin tamamı referans bileşik olan α -kojik asitten (% 83,39 \pm 0,88) daha düşük inhibisyon göstermiştir. Çizelge 4.1.'de verilen ön tarama sonuçlarımızda; TYR'a karşı 10 mM konsantrasyonda kersetin, fisetin, EGCG ve pelargonidin adlı fenolik bileşiklerin %50'nin üzerinde inhibisyon gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek etki kersetinde (% 77,82 \pm 2,14) gözlenmiştir. Ayrıca fisetin, EGCG ve pelargonidin sırasıyla % 71,36 \pm 0,77, % 67,12 \pm 1,18 ve % 52,01 \pm 1,78 inhibisyon göstermiştir.

Çizelge 4.1. Tez gereçlerini teşkil eden fenolik bileşiklerin TYR inhibitör etkileri

| No. | Fenolik Bileşikler | TYR İnhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a) (10 mM) |
|-----|----------------------------|--|
| 1. | Gallik asit | _{-b} |
| 2. | Sirinjik asit | 5,31 \pm 0,35 |
| 3. | Vanilik asit | _{-b} |
| 4. | Klorojenik asit | 45,15 \pm 1,32 |
| 5. | Elajik asit | _{-b} |
| 6. | <i>Trans</i> -Ferulik asit | 10,16 \pm 4,05 |
| 7. | <i>p</i> -Kumarik asit | 18,93 \pm 1,66 |
| 8. | Kafeik asit | 20,85 \pm 3,56 |
| 9. | Rozmarinik asit | 6,54 \pm 3,14 |
| 10. | D-(-)-Kinik asit | 8,08 \pm 2,38 |
| 11. | Oleuropein | _{-b} |
| 12. | <i>p</i> -Tirozol | 6,69 \pm 3,60 |
| 13. | Hidroksitirozol | 16 \pm 1,2 |
| 14. | Pelargonidin | 52,01 \pm 1,78 |
| 15. | Resveratrol | 43,46 \pm 0,97 |
| 16. | Kateşin | _{-b} |
| 17. | EGCG | 67,12 \pm 1,18 |
| 18. | Kersetin | 77,82 \pm 2,14 |
| 19. | Kemferol | _{-b} |
| 20. | Mirisetin | 7,4 \pm 0,87 |
| 21. | Fisetin | 71,36 \pm 0,77 |
| 22. | Hiperosit | _{-b} |
| 23. | Luteolin | 31,02 \pm 2,3 |
| 24. | Apigenin | _{-b} |
| 25. | Taksifolin | 32,04 \pm 2,8 |
| 26. | Trisin | 9,10 \pm 1,53 |
| 27. | Tangeretin | _{-b} |
| 28. | Diosmetin | 14,53 \pm 0,81 |
| 29. | Hesperetin | 35,66 \pm 3,76 |
| 30. | Naringin | 3,45 \pm 1,75 |
| 31. | İzokersitrin | 11,74 \pm 1,9 |
| 32. | Orientin | 15,46 \pm 5,24 |
| 33. | Viteksin | _{-b} |
| 34. | Daidzein | _{-b} |

Çizelge 4.1. (devamı) Tez gereçlerini teşkil eden fenolik bileşiklerin TYR inhibitör etkileri

| | | |
|----------|----------------------|------------------|
| 35. | Glisitein | - ^b |
| 36. | Amentoflavon | - ^b |
| Referans | α -Kojik asit | 83,39 \pm 0,88 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bİnhibisyon gözlenmedi

Çizelge 4.1.'de verilen ilk tarama sonuçlarımızda; TYR'a karşı 10 mM konsantrasyonda %50'nin üzerinde inhibisyon gösterdiği tespit edilen kersetin, fisetin, EGCG ve pelargonidin'in IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Etkili bileşiklerin TYR'a karşı IC₅₀ değerleri

| Fenolik Bileşikler | TYR İnhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a) (10 mM) | IC ₅₀ (mM) (Ort \pm S.S.) |
|-----------------------------------|--|---|
| Kersetin | 77,81 \pm 1,13 | 5,89 \pm 0,01 |
| Fisetin | 71,36 \pm 0,77 | 4,26 \pm 0,70 |
| EGCG | 67,12 \pm 1,17 | 6,41 \pm 0,27 |
| Pelargonidin | 52,80 \pm 1,78 | 9,34 \pm 0,05 |
| α -Kojik asit ^b | 85,25 \pm 2,25 | 0,23 \pm 0,03 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bReferans bileşik

4.1.1. Etkili bileşik kombinasyonlarının TYR inhibisyonuna ait bulgular

İlk tarama sonuçlarımızda; TYR'a karşı 10 mM konsantrasyonda kersetin, fisetin, (-)-EGCG ve pelargonidin adlı fenolik bileşiklerin %50'nin üzerinde inhibisyon gösterdiği bulunmuştur. İkili kombinasyonlarının TYR aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi olup olmadığını saptamak için moleküllerin her biri 10 mM'da hazırlanmış ve bunlardan 1:1 oranında ikili kombinasyonlar hazırlanarak deney prosedürü uygulanmış ve %50'nin üzerinde inhibisyon gösterdikleri tespit edilmiştir. Çizelge 4.3.'te verilen sonuçlar elde edilmiştir.

Kersetin ve fisetin tek başlarına kullanıldığında sırasıyla % 77,81 \pm 1,13 ve % 71,36 \pm 0,77 inhibisyon gösterirken, 1:1 oranında hazırlanan kombinasyonları daha yüksek inhibisyon (% 83,59 \pm 0,63) göstermiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Hazırlanan ikili kombinasyonların (1:1) TYR inhibitör etkileri

| İkili Kombinasyonlar (1:1) | TYR inhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a) (10 mM) |
|----------------------------|--|
| Fisetin:Kersetin | 83,59 \pm 0,63 |

Çizelge 4.3. (devam) Hazırlanan ikili kombinasyonların (1:1) TYR inhibitör etkileri

| | |
|-----------------------------------|--------------|
| Fisetin:EGCG | 72,46 ± 2,88 |
| Fisetin:Pelargonidin | 63,91 ± 1,37 |
| Kersetin:EGCG | 46,60 ± 3,49 |
| Kersetin:Pelargonidin | 64,88 ± 0,81 |
| EGCG:Pelargonidin | 70,97 ± 1,86 |
| α -Kojik asit ^b | 91,33 ± 0,25 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bReferans bileşik

Daha sonra, TYR'a karşı etkili inhibitör bileşiklerden hareketle 1:1:1 oranında üçlü kombinasyonları hazırlanarak 10 mM'da TYR inhibisyon deneyleri yapılmıştır. Hazırlanan tüm kombinasyonların % 50'nin üzerinde inhibisyon gösterdikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Sırasıyla üçlü kombinasyonlardan fisetin:kersetin:EGCG (1:1:1) kombinasyonu için % 77,85 ± 2,18, fisetin:kersetin:pelargonidin (1:1:1) kombinasyonu için %75,30 ± 3,07, EGCG:kersetin:pelargonidin (1:1:1) kombinasyonu için %76,32 ± 3,18 ve EGCG:fisetin:pelargonidin (1:1:1) kombinasyonu için %70,80 ± 2,59 inhibisyon değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.4. Hazırlanan üçlü kombinasyonların (1:1:1) TYR inhibitör etkileri

| Üçlü Kombinasyonlar (1:1:1) | TYR inhibisyonu (% İnhibisyon ± S.S. ^a) (10 mM) |
|-----------------------------------|--|
| Fisetin:Kersetin:EGCG | 77,85 ± 2,18 |
| Fisetin:Kersetin:Pelargonidin | 75,30 ± 3,07 |
| EGCG:Kersetin:Pelargonidin | 76,32 ± 3,18 |
| EGCG:Fisetin:Pelargonidin | 70,80 ± 2,59 |
| α -Kojik asit ^b | 85,25 ± 2,25 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bReferans bileşik

4.2. Elastaz İnhibisyonuna Ait Bulgular

TYR'a karşı inhibitör aktivite gösteren fisetin ve kersetin tek olarak, ayrıca fisetin:kersetin:EGCG/pelargonidin içerecek şekilde 1:1:1 oranında hazırlanan üçlü kombinasyonların elastaz üzerinde inhibitör etkisi olup olmadığını saptamak için moleküllerin her biri 10 mM'da hazırlanmış ve aynı deney prosedürü uygulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.5.'te verilmiştir. Elastaz enzimine karşı kersetin % 80,69 ± 1,72 inhibisyon (IC₅₀: 6,59 ± 0,18 mM), fisetin ise % 60,23 ± 2,36 inhibisyon (IC₅₀: 8,65 ± 0,18 mM) göstermiştir.

Çizelge 4.5. Seçilen fenolik bileşiklere ait elastaz inhibisyonu sonuçları

| Bileşikler ve kombinasyonlar | Elastaz İnhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a) (10 mM) | IC ₅₀ (mM) (Ort. \pm S.S.) |
|-------------------------------|--|--|
| Fisetin | 60,23 \pm 2,36 | 8,65 \pm 0,18 |
| Kersetin | 80,69 \pm 1,72 | 6,59 \pm 0,18 |
| Fisetin:Kersetin:EGCG | 48,27 \pm 2,21 | - ^b |
| Fisetin:Kersetin:Pelargonidin | 53,80 \pm 1,04 | 8,97 \pm 0,21 |
| PVC ^c | 99,65 \pm 0,08 | |

^aStandart sapma (n: 3), ^bİnhibisyon gözlenmedi, ^cReferans bileşik

4.3. Kolajenaz İnhibisyonuna Ait Bulgular

Üçlü kombinasyonlar 10 mM konsantrasyonda test edilmiş ve EGCG dışında hepsi %50'nin altında inhibisyon göstermiştir. EGCG ise % 58,1 \pm 2,78 inhibisyona yol açmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Fenolik bileşiklere ait kolajenaz inhibisyonu sonuçları

| Bileşik ismi | Kolajenaz İnhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a) (10 mM) | IC ₅₀ (mM) (Ort. \pm S.S.) |
|--------------------------|--|--|
| EGCG | 58,1 \pm 2,78 | 3,40 \pm 0,41 |
| Fenantrolin ^b | 87,83 \pm 1,56 | |

^aStandart sapma (n: 3), ^bReferans bileşik

4.4. XO İnhibisyonuna Ait Bulgular

Tez gereçlerimizi oluşturan 36 adet fenolik bileşik XO'a karşı test edilmiştir. Allopirunol (% 99,31 \pm 0,27) referans bileşik olarak kullanılmıştır. Sırasıyla rozmarinik asit % 65,21 \pm 2,88, kafeik asit % 60,83 \pm 3,87, *p*-kumarik asit % 85,70 \pm 2,61, resveratrol % 53,13 \pm 2,26, amentoflavon % 52,26 \pm 0,85, viteksin % 55,23 \pm 3,51, kemferol % 79,07 \pm 0,17, fisetin % 77,12 \pm 1,89, (-)-EGCG % 92,18 \pm 2,65, pelargonidin % 62,53 \pm 1,57, kersetin 3- β -D-galaktoz % 81,28 \pm 7,71, mirisetin % 76,07 \pm 0,67, izokersitrin % 73,49 \pm 0,23, luteolin % 77,41 \pm 3,77 ve taksifolin % 68,21 \pm 3,45 oranında inhibisyon göstermiştir (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Fenolik bileşiklere ait XO inhibisyonu sonuçları

| Bileşik ismi | XO İnhibisyonu (% İnhibisyon \pm S.S. ^a) (10 mM) | IC ₅₀ (mM) (Ort. \pm S.S.) |
|---------------|---|--|
| Gallik asit | 25,53 \pm 2,85 | |
| Sirinjik Asit | 7,90 \pm 2,20 | |
| Vanilik asit | 17,15 \pm 2,28 | |

Çizelge 4.7. (devamı) Fenolik bileşiklere ait XO inhibisyonu sonuçları

| | | |
|----------------------------|--------------|-------------|
| Klorojenik asit | 8,77 ± 3,12 | |
| Elajik asit | 40,49 ± 1,20 | |
| <i>Trans</i> -Ferulik asit | 34,45 ± 1,30 | |
| <i>p</i> -Kumarik asit | 85,70 ± 2,61 | 5,54 ± 0,08 |
| Kafeik asit | 60,83 ± 3,87 | 8,31 ± 0,52 |
| Rozmarinik asit | 65,21 ± 2,88 | 8,26 ± 0,08 |
| D-(-)-Kinik asit | 11,57 ± 1,90 | |
| Oleuropein | 18,75 ± 0,71 | |
| <i>p</i> -Tirozol | 15,84 ± 3,61 | |
| Hidroksitirozol | 15,42 ± 2,27 | |
| Pelargonidin | 62,53 ± 1,57 | 6,80 ± 0,15 |
| Resveratrol | 53,13 ± 2,26 | 9,49 ± 0,13 |
| Kateşin | 6,33 ± 0,45 | |
| EGCG | 92,18 ± 2,65 | 4,32 ± 0,02 |
| Kersetin | 28,15 ± 1,09 | |
| Kemferol | 79,07 ± 0,17 | 4,70 ± 0,09 |
| Mirisetin | 76,07 ± 0,67 | 4,55 ± 0,07 |
| Fisetin | 77,12 ± 1,89 | 5,25 ± 0,10 |
| Hiperosit | 81,28 ± 7,71 | 6,26 ± 0,31 |
| Luteolin | 77,41 ± 3,77 | 5,43 ± 0,06 |
| Apigenin | 10,39 ± 1,34 | |
| Taksifolin | 68,21 ± 3,45 | 5,70 ± 0,13 |
| Trisin | 11,45 ± 0,87 | |
| Tangeretin | 24,85 ± 1,24 | |
| Diosmetin | 2,07 ± 0,68 | |
| Hesperetin | 24,53 ± 2,47 | |
| Naringin | 40,98 ± 1,05 | |
| İzokersitrin | 73,49 ± 0,23 | 5,13 ± 0,15 |
| Orientin | 47,03 ± 2,08 | |
| Viteksin | 55,23 ± 3,51 | 9,35 ± 0,31 |
| Daidzein | 18,30 ± 2,83 | |
| Glisitein | 5,75 ± 1,29 | |
| Amentoflavon | 52,26 ± 0,85 | 9,74 ± 0,08 |
| Allopirunol ^b | 99,31 ± 0,27 | 3,12 ± 0,03 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bReferans bileşik

4.5. Antioksidan Aktivite Tayinine Ait Bulgular

Tez çalışmamızda, 36 adet bitki fenoliğinin antioksidan potansiyeli *in vitro* yöntemlerle taranmıştır. Bileşikler, 10 mM'da DPPH radikal süpürücü aktivite, CUPRAC ve FRAP deneyleri kullanılarak test edilmiştir. Kapsamlı taramamız sonucunda, oleuropein, gallik asit, kafeik asit, rosmarinik asit, kateşin, kersetin, kemferol, luteolin, izokersitrin, fisetin, EGCG ve viteksin en etkili fenolik antioksidanlar olarak tespit edilmiştir.

4.5.1. DPPH radikal süpürücü aktivite yöntemi

Test edilen fenolik bileşikler arasında en aktif olanlar gallik asit, klorojenik asit, rozmarinik asit, oleuropein, hidroksitirozol, EGCG, kersetin, kemferol, fisetin, taksifolin olarak saptanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Fenolik bileşiklere ait DPPH radikal süpürücü etki sonuçları

| Bileşik ismi | DPPH radikal süpürücü etki (10 mM) (% Süpürücü Etki \pm S.S. ^a) |
|----------------------------|--|
| Gallik asit | 90,50 \pm 0,39 |
| Sirinjik Asit | 89,96 \pm 0,89 |
| Vanilik asit | 50,29 \pm 1,03 |
| Klorojenik asit | 91,59 \pm 0,08 |
| Elajik asit | 87,98 \pm 2,34 |
| <i>Trans</i> -Ferulik asit | 89,22 \pm 0,69 |
| <i>p</i> -Kumarik asit | 28,59 \pm 1,24 |
| Kafeik asit | 89,66 \pm 0,09 |
| Rozmarinik asit | 90,41 \pm 0,31 |
| D-(-)-Kinik asit | 18,69 \pm 0,42 |
| Oleuropein | 90,95 \pm 0,21 |
| <i>p</i> -Tirozol | 30,51 \pm 0,82 |
| Hidroksitirozol | 91,09 \pm 0,89 |
| Pelargonidin | 38,74 \pm 0,25 |
| Resveratrol | 87,14 \pm 1,71 |
| Kateşin | 81,37 \pm 0,07 |
| EGCG | 91,09 \pm 0,35 |
| Kersetin | 92,14 \pm 0,25 |
| Kemferol | 92,08 \pm 0,85 |
| Mirisetin | 86,69 \pm 0,08 |
| Fisetin | 91,09 \pm 0,12 |
| Hiperosit | 86,65 \pm 0,25 |
| Luteolin | 88,13 \pm 0,81 |
| Apigenin | 20,99 \pm 2,40 |
| Taksifolin | 91,09 \pm 1,40 |
| Trisin | 25,82 \pm 0,84 |
| Tangeretin | 25,76 \pm 0,57 |
| Diosmetin | 47,08 \pm 0,13 |
| Hesperetin | 68,94 \pm 4,01 |
| Naringin | 14,99 \pm 0,74 |
| İzokersitrin | 87,14 \pm 1,05 |
| Orientin | 80,05 \pm 3,39 |
| Viteksin | 22,77 \pm 2,62 |
| Daidzein | 25,82 \pm 0,87 |
| Glisitein | 24,12 \pm 0,31 |
| Amentoflavon | 24,83 \pm 4,76 |
| Kersetin ^b | 92,14 \pm 0,25 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bReferans bileşik

4.5.2. FRAP yöntemi

Test edilen tüm bileşiklerin referansa (kersetin) yakın veya daha iyi FRAP değerlerine sahip olduğu ve taksifolinin en yüksek FRAP değerine sahip olduğu bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 4.9.'da verilmektedir.

Çizelge 4.9. Fenolik bileşiklere ait FRAP yöntemi antioksidan etki tayini sonuçları

| Bileşik İsmi | FRAP ^a ± S.S. ^b (10 mM) |
|----------------------------|---|
| Gallik asit | 1,61 ± 0,02 |
| Sirinjik asit | 0,76 ± 0,05 |
| Vanilik asit | 1,17 ± 0,01 |
| Klorojenik asit | 1,57 ± 0,11 |
| Elajik asit | 1,59 ± 0,43 |
| <i>Trans</i> -Ferulik asit | 1,53 ± 0,07 |
| <i>p</i> -Kumarik asit | 0,92 ± 0,02 |
| Kafeik asit | 1,40 ± 0,12 |
| Rozmarinik asit | 1,83 ± 0,05 |
| D-(-)-Kinik asit | 0,94 ± 0,24 |
| Oleuropein | 0,83 ± 0,01 |
| <i>p</i> -Tirozol | 1,04 ± 0,12 |
| Hidroksitirozol | 1,86 ± 0,05 |
| Pelargonidin | 1,25 ± 0,02 |
| Resveratrol | 1,10 ± 0,26 |
| Kateşin | 1,51 ± 0,03 |
| EGCG | 1,31 ± 0,05 |
| Kersetin | 1,84 ± 0,03 |
| Kemferol | 0,99 ± 0,07 |
| Mirisetin | 1,78 ± 0,23 |
| Fisetin | 1,16 ± 0,19 |
| Hiperosit | 1,17 ± 0,08 |
| Luteolin | 1,70 ± 0,22 |
| Apigenin | 1,46 ± 0,16 |
| Taksifolin | 2,00 ± 0,10 |
| Trisin | 0,98 ± 0,08 |
| Tangeretin | 0,98 ± 0,27 |
| Diosmetin | 1,40 ± 0,10 |
| Hesperetin | 0,94 ± 0,13 |
| Naringin | 0,99 ± 0,09 |
| İzokersitrin | 1,76 ± 0,06 |
| Orientin | 1,49 ± 0,38 |
| Viteksin | 1,13 ± 0,16 |
| Daidzein | 1,46 ± 0,29 |
| Glisitein | 1,09 ± 0,02 |
| Amentoflavon | 1,75 ± 0,69 |
| Kersetin ^c | 1,84 ± 0,03 |

^aYüksek absorbans değeri yüksek FRAP anlamına gelmektedir, ^bStandart sapma (n: 3), ^cReferans bileşik

4.5.3. CUPRAC yöntemi

CUPRAC deneylerinde referansa (gallik asit) kıyasla en aktif olan fenolikler olarak kersetin, izokersitrin, luteolin, kemferol, kateşin ve oleuropein bulunmuş olup, sonuçlar Çizelge 4.10.'da verilmektedir.

Çizelge 4.10. Fenolik bileşiklere ait CUPRAC yöntemi antioksidan etki tayini sonuçları

| Bileşik İsmi | CUPRAC (10 mM) (450 nm ± S.S. ^a) |
|----------------------------|---|
| Gallik asit | 3,40 ± 0,01 |
| Sirinjik asit | 1,57 ± 0,03 |
| Vanilik asit | 1,61 ± 0,07 |
| Klorojenik asit | 2,37 ± 0,08 |
| Elajik asit | 0,52 ± 0,08 |
| <i>Trans</i> -Ferulik asit | 1,58 ± 0,01 |
| <i>p</i> -Kumarik asit | 1,07 ± 0,09 |
| Kafeik asit | 2,23 ± 0,16 |
| Rozmarinik asit | 2,71 ± 0,12 |
| D-(-)-Kinik asit | 0,31 ± 0,01 |
| Oleuropein | 3,11 ± 0,50 |
| <i>p</i> -Tirozol | 0,67 ± 0,01 |
| Hidroksitirozol | 1,80 ± 0,04 |
| Pelargonidin | 1,30 ± 0,10 |
| Resveratrol | 1,69 ± 0,04 |
| Kateşin | 3,33 ± 0,28 |
| EGCG | 1,96 ± 0,20 |
| Kersetin | 3,99 ± 0,01 |
| Kemferol | 3,60 ± 0,28 |
| Mirisetin | - ^b |
| Fisetin | 2,66 ± 0,36 |
| Hiperosit | - |
| Luteolin | 3,96 ± 0,05 |
| Apigenin | 0,98 ± 0,30 |
| Taksifolin | 1,46 ± 0,11 |
| Trisin | 0,07 ± 0,01 |
| Tangeretin | 0,26 ± 0,01 |
| Diosmetin | 0,43 ± 0,04 |
| Hesperetin | 1,79 ± 0,17 |
| Naringin | 0,19 ± 0,01 |
| İzokersitrin | 3,99 ± 0,01 |
| Orientin | 1,74 ± 0,24 |
| Viteksin | 0,17 ± 0,01 |
| Daidzein | 0,47 ± 0,06 |
| Glisitein | 0,27 ± 0,01 |
| Amentoflavon | 1,69 ± 0,04 |
| Gallik asit ^c | 3,40 ± 0,01 |

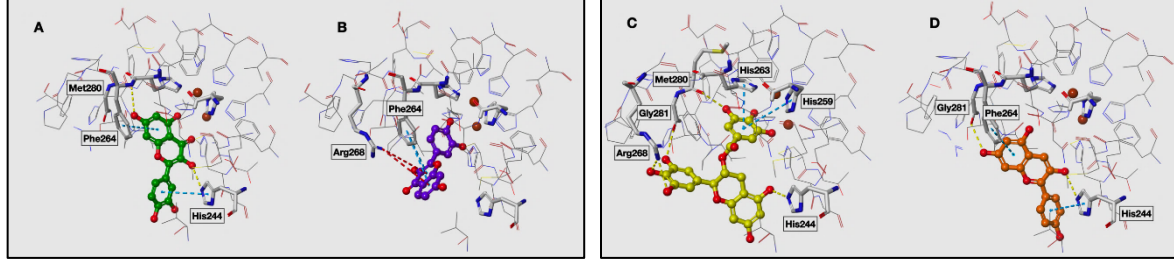
^aYüksek absorbans değeri yüksek CUPRAC anlamına gelmektedir, ^bAbsorbans yok ^cReferans bileşik

4.6. Moleküler Kenetlenme Deneylelerine ait Bulgular

En yüksek TYR inhibitör etkiye sahip olduğu tespit edilen fenolik bileşikler olan kersetin, fisetin, EGCG ve pelargonidin TYR ile etkileşimlerinin *in silico* ortamda incelenmesi amacıyla moleküler kenetlenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda reseptör olarak inhibitör olarak tropolon bağlı *Agaricus bisporus* mantarından elde edilen TYR (PDB kodu: 2Y9X) seçilmiştir. TYR'ın enzimatik yapısı 392 amino asitten oluşan iki H alt birimi ve 150 aminoasitten oluşan iki L alt birimi içerir. TYR'ın H alt birimi, His61, His85 ve His94 olmak üzere 3 adet histidinin birinci bakır iyonu ve His259, His263 ve His296 ile koordine edilmiş ikinci bakır iyonu ile etkileşime girdiği 2 çekirdekli bakır bölgesi içerir. TYR inhibisyonunda rol oynayan en önemli faktör, aktivitede önemli bir rol oynayan bakır iyonu ile koordine edilmiş histidin amino asitleriyle etkileşimin meydana gelmesidir. Moleküler kenetlenme çalışmasının sonuçlarına göre, TYR'ı yaklaşık % 78 oranda inhibe eden kersetin, kromon halkası ile aktif bölgedeki bakır iyonlarına yakın bir bölgeye yerleşmiş, halka üzerinde 3. konumda yer alan hidroksil grubu His244 ile 7. konumdaki hidroksil grubu ise Met280 ile hidrojen bağ meydana getirmiştir. Bu etkileşimlere ek olarak kromon halkası ile Phe264 ve kromon halkasının 2. konumuna bağlı fenil halkasıyla His244 arasında π - π etkileşimleri gözlenmiştir. Kersetin için bağlanma enerjisi -8.169 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Kersetine yapısal olarak çok benzeyen ve TYR inhibitör etkisi % 71 olarak bulunan fisetin, aktif bölgede kersetine göre ters bir bağlantı modu göstermiştir. Fisetin yapısındaki kromon halkasının 2. konumunda yer alan fenil halkası bakır bağlanma bölgesine doğru yönelse de o bölgedeki aminoasitleriyle etkileşim göstermemiştir. Kromon halkası ise Phe264 ile π - π etkileşimleri gösterirken, Arg268 ile π -kasyon etkileşimlerine girmiştir. Fisetin için bağlanma enerjisi -7.198 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. TYR'ı % 67 oranında inhibe eden EGCG için belirlenen bağlantı konformasyonu incelendiğinde, kromon halkasının 2. konumunda yer alan fenil halkası üzerindeki hidroksil gruplarının Arg268 ve Gly281 ile hidrojen bağları oluşturduğu gözlenmiştir. Bunun yanında, gallik asit kalıntısının bakır bağlanma bölgesine yönelerek His259 ve His263 ile π - π etkileşimleri gösterdiği, Met280 ile de hidrojen bağ oluşturduğu tespit edilmiştir. His244 ile de kromon halkasının 5. konumunda yer alan hidroksil grubu arasında hidrojen bağ meydana gelmiştir. EGCG için bağlanma enerjisi -7.893 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. Moleküler kenetlenme çalışmaları için seçilen bileşikler arasında TYR inhibitör etkisi en düşük olan (% 52) pelargonidin, enzim aktif bölgesine Phe264 ve His244 ile meydana getirdiği π - π etkileşimleri ve kromon halkasının 3. ve 7. konumlarında yer alan hidroksil gruplarının

sırasıyla His244 ve Gly281 ile oluşturduğu hidrojen bağları sayesinde yerleşmiştir. Pelargonidin için bağlanma enerjisi -5.853 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

Seçilen fenolik bileşikler için moleküler kenetlenme deneylerinin sonuçları *in vitro* TYR inhibisyon testinde bulunan değerler ile uyumlu bulunmuş olup, Şekil 4.1.'de gösterilmiştir:



Şekil 4.1. TYR enzim bölgesinde (PDB kodu: 2Y9X) kersetin (A), fisetin (B), EGCG (C) ve pelargonidin (D) için belirlenen bağlantı konformasyonları (Hidrojen bağları sarı, π - π etkileşimleri turkuaz, π -kasyon etkileşimleri ise kırmızı kesikli çizgilerle gösterilmiştir).

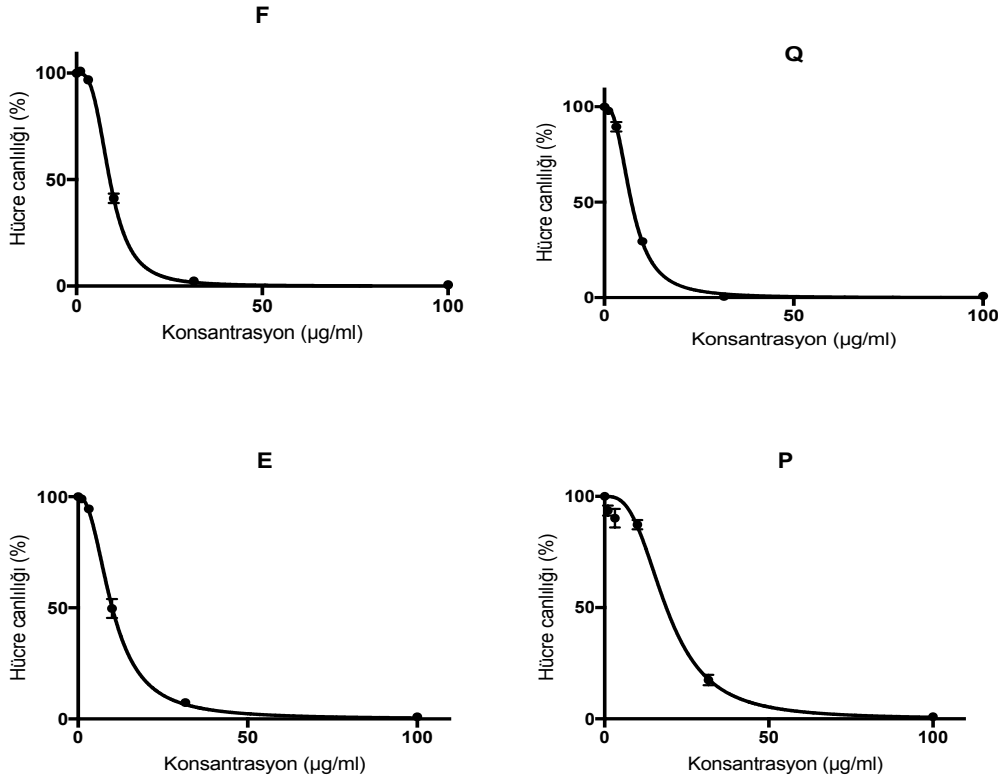
4.7. Sitotoksosite Analizine Ait Bulgular

SKMEL 30 hücrelerine 72 saat maruz bırakılan fisetin (F), kersetin (Q), EGCG (E), pelargonidin (P) bileşikleri ile fisetin:kersetin:EGCG ve pelargonidin:kersetin:EGCG kombinasyonlarının (1:1:1) sitotoksosite değerlendirilmesi yapılmıştır, referans ilaç olarak doksorubisin kullanılmıştır. Fenolik bileşikler ve kombinasyonlarının sitotoksosite değerlendirilmesi ile hesaplanan IC_{50} değerleri Çizelge 4.11.'de, sitotoksosite grafikleri ise Şekil 4.2.'de verilmektedir.

Çizelge 4.11. SKMEL 30 hücrelerine 72 saat maruz bırakılan fenolik bileşikler ve kombinasyonlarının sitotoksosite değerlendirilmesi ile hesaplanan IC_{50} değerleri

| Fenolik bileşikler ve kombinasyonları | IC_{50} (Ortalama \pm S.S. ^a) (μ g/ml) |
|---------------------------------------|---|
| Fisetin | 8,96 \pm 0,15 |
| Kersetin | 7,15 \pm 0,16 |
| EGCG | 10,07 \pm 0,29 |
| Pelargonidin | 18,79 \pm 1,01 |
| Fisetin:kersetin:EGCG (1:1:1) | 8,45 \pm 0,28 |
| Pelargonidin:kersetin:EGCG (1:1:1) | 12,86 \pm 0,36 |
| Doksorubisin ^b | 0,17 \pm 0,01 μ M |

^aStandart sapma (n: 3), ^bReferans bileşik



Şekil 4.2. TYR inhibitörü olan fenolik bileşiklere ait sitotoksosite grafikleri (F: Fisetin, Q: Kersetin, E: EGCG, P: Pelargonidin)

4.8. Kozmetik Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.8.1. Nanoemülsiyonların kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları

Kersetin ve fisetin içeren nanoemülsiyonun kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $\%60 \text{ RN} \pm \%5$ koşullarında başlangıç, 1. ay ve 3. aylarda yapılan damlacık büyüklüğü ve dağılımı, zeta potansiyeli, viskozite ölçüm değerleri, pH değerleri, görünüş, renk ve faz ayrışması değerlendirmeleriyle gerçekleştirilmiştir. Tüm viskozite ölçümleri için 64 no'lu spindle, $\%20$ tork değerinde ve 30 rpm'de kullanılmıştır (Brookfield LVDPlus). Nanoemülsiyonun pH ölçümleri (Milwaukee PH56) oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı altında sürekli karıştırma sağlanarak yapılmıştır. Görünüş, renk ve faz ayrışması değerlendirilmesi gözleme dayalı olarak tayin edilmiştir. DS, DS dağılımı ve zeta potansiyel değerleri Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm işlemleri 3'er kez tekrarlanarak elde edilen değerlerin X_{ort} ve S.S. değerleri hesaplanmıştır.

Kersetin ve fisetin (1:1) kombinasyonu içeren nanoemülsiyon üzerindeki kısa süreli fiziksel stabilite çalışmaları bulguları Çizelge 4.12.'de sunulmaktadır. Elde edilen bulgulara göre nanoemülsiyonların 3 ay süresince fiziksel stabilitelerini koruduğu ve reolojik özelliklerinin değişmediği gözlenmiştir. DS ve zeta potansiyellerinde anlamlı bir değişme gözlenmemesi, fiziksel stabilitenin korunduğu anlamına gelmektedir.

Çizelge 4.12. Kersetin ve fisetin (1:1) kombinasyonu içeren nanoemülsiyona ait fiziksel stabilite sonuçları (25 °C ± 2 °C, %60 RN ± %5)

| Değerlendirme Kriterleri | İlk Ölçüm | 1. Ay | 3. Ay |
|---|---------------|---------------|---------------|
| Görünüş | Homojen | Homojen | Homojen |
| Renk | Açık sarı | Açık sarı | Açık sarı |
| Faz Ayırışması | Gözlenmedi | Gözlenmedi | Gözlenmedi |
| DS ^b (nm, Ort. ± S.S. ^a) | 228,14 ± 23,1 | 259,05 ± 10,3 | 245,40 ± 51,2 |
| PDI (Ort. ± S.S.) | 0,177 ± 0,001 | 0,201 ± 0,014 | 0,195 ± 0,025 |
| Zeta Potansiyel (mV, Ort. ± S.S.) | -34,7 ± 0,8 | -30,7 ± 2,5 | -31,8 ± 4,9 |
| Viskozite (cP, Ort. ± S.S.) | 1270 ± 56 | 1238 ± 48 | 1214 ± 23 |
| pH (Ort. ± S.S.) | 6,7 ± 0,02 | 6,6 ± 0,04 | 6,8 ± 0,01 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bDamlacık Büyüklüğü

Yağ fazı (Hint yağı) ve su fazı (Tween 80, PEG400 ve distile su) 60–65 °C'ye getirilmiş ve homojenizatör (Highshear Silent Crusher M, Heidolph, Germany) ile 25 000 rpm'de 1 dk süre ile homojenize edilmiştir. Kaba emülsiyon, %75 genlik (amplitude) değerinde 5 dk süre ile ultrasonikasyona (Bandelin, Sonopuls 2070 Germany) tabi tutulmuştur. Oda sıcaklığına gelen nanoemülsiyonlar vida kapaklı viallere alınarak, muhafaza edilmiştir.

Nanoemülsiyonların oluşumunda kritik kontrol parametreleri olarak DB ve PDI değerleri göz önüne alınarak, formülasyon parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. Formülasyon parametreleri olarak yağ fazı ve su fazının farklı oranları tasarım alanı olarak belirlenerek 2³ faktöriyel tasarımdan faydalanılmıştır. Bağımsız değişkenlerin hint yağı (% 5, % 10), Tween 80 (% 2,5 ve % 5) ve PEG 400 (% 2,5 ve %5) bağımlı değişkenler üzerine olan etkileri ve etkileşim analizi için her deney 3 kere tekrarlanmış ve toplam 24 deney yapılmıştır (Çizelge 4.13.- 4.14.).

Çizelge 4.13. Nanoemülsiyonların hazırlanmasında deney düzeni ve bağlı parametre sonuçları

| Sıra | A: Hint Yağı | B: PEG ^a | C: Tween 80 | DB ^b | PDI ^c |
|------|--------------|---------------------|-------------|-----------------|------------------|
| | % | % | % | nm | |
| 1 | 10 | 2,5 | 5 | 203,5 | 0,267 |
| 2 | 10 | 2,5 | 5 | 201,5 | 0,273 |
| 3 | 5 | 2,5 | 5 | 183,7 | 0,293 |
| 4 | 10 | 5 | 5 | 208,7 | 0,249 |
| 5 | 10 | 5 | 2,5 | 264,2 | 0,244 |
| 6 | 5 | 2,5 | 5 | 174,4 | 0,283 |
| 7 | 10 | 2,5 | 2,5 | 263,7 | 0,335 |
| 8 | 10 | 2,5 | 5 | 195,7 | 0,263 |
| 9 | 10 | 5 | 2,5 | 253,2 | 0,243 |
| 10 | 5 | 2,5 | 5 | 169,1 | 0,421 |
| 11 | 5 | 5 | 5 | 167,5 | 0,283 |
| 12 | 5 | 5 | 2,5 | 182,4 | 0,256 |
| 13 | 10 | 5 | 5 | 200,2 | 0,272 |
| 14 | 5 | 5 | 2,5 | 177,3 | 0,258 |
| 15 | 5 | 2,5 | 2,5 | 197,0 | 0,270 |
| 16 | 10 | 2,5 | 2,5 | 254,1 | 0,176 |
| 17 | 5 | 5 | 5 | 160,0 | 0,284 |
| 18 | 5 | 2,5 | 2,5 | 188,6 | 0,261 |
| 19 | 10 | 2,5 | 2,5 | 252,4 | 0,145 |
| 20 | 10 | 5 | 2,5 | 246,7 | 0,207 |
| 21 | 10 | 5 | 5 | 199,1 | 0,254 |
| 22 | 5 | 2,5 | 2,5 | 184,5 | 0,259 |
| 23 | 5 | 5 | 5 | 149,7 | 0,352 |
| 24 | 5 | 5 | 2,5 | 170,9 | 0,245 |

^aPolietilen glikol, ^bDamlacık büyüklüğü, ^cPolidispersite indeksi

Çizelge 4.14. Nanoemüljellerin DB ve DB dağılımı için tanımlayıcı istatistikleri

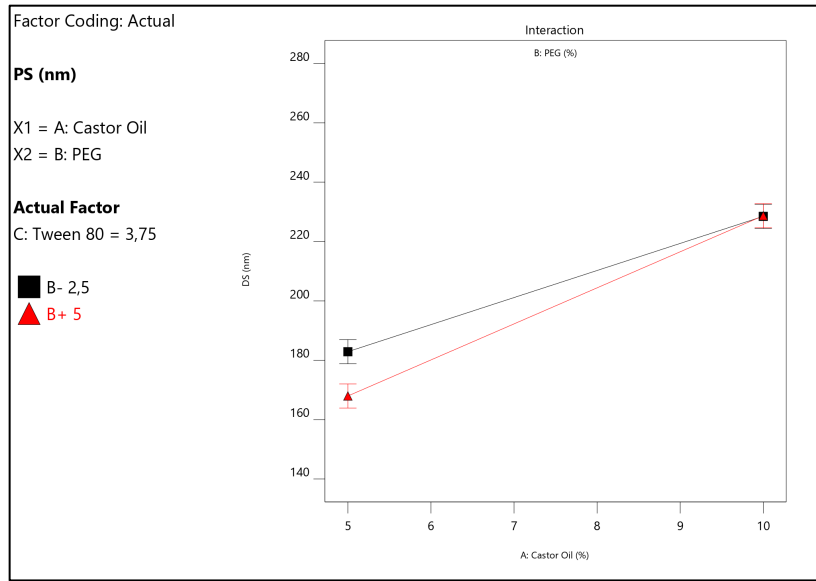
| Yanıt | Değişken | Birim | Deney | Analiz | Minimum | Maksimum | Ort. | S.S. ^a |
|-------|------------------|-------|-------|------------|---------|----------|--------|-------------------|
| R1 | DB ^b | nm | 24 | Faktöriyel | 149,7 | 264,2 | 202,00 | 34,88 |
| R2 | PDI ^c | | 24 | Faktöriyel | 0,145 | 0,421 | 0,2664 | 0,0537 |

^aStandart sapma (n: 3), ^bDamlacık büyüklüğü, ^cPolidispersite indeksi

Çizelge 4.15. DS için bağımsız değişkenlerin etkileşimleri

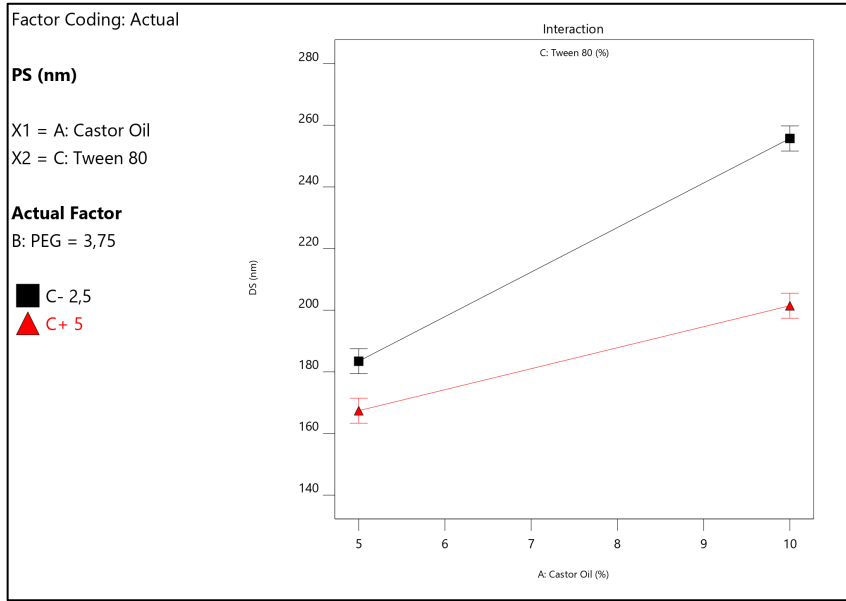
| | F-değeri | p-değeri |
|--------------|----------|----------|
| Model | 101,63 | < 0.0001 |
| A-Hint Yağı | 379,67 | < 0.0001 |
| B-PEG | 7,27 | 0,0153 |
| C-Tween 80 | 166,08 | < 0.0001 |
| AB | 7,68 | 0,0131 |
| AC | 49,06 | < 0.0001 |
| BC | 0,0078 | 0,9304 |

Yapılan 2^3 faktöriyel analize göre damlacık büyüklüğünün kullanılan hint yağı, PEG ve Tween 80 oranlarına göre anlamlı şekilde değiştiği, aynı zamanda hint yağı – PEG ve hint yağı – Tween 80 arasında etkileşim meydana geldiği Çizelge 4.15.’te görülmektedir ($p < 0,05$). Bahsedilen etkileşimlere ait etkileşim grafikleri Şekil 4.3. ile 4.4.’te; etkileşimlere ait 3D yüzey grafikleri Şekil 4.5. – 4.7.’de verilmektedir.



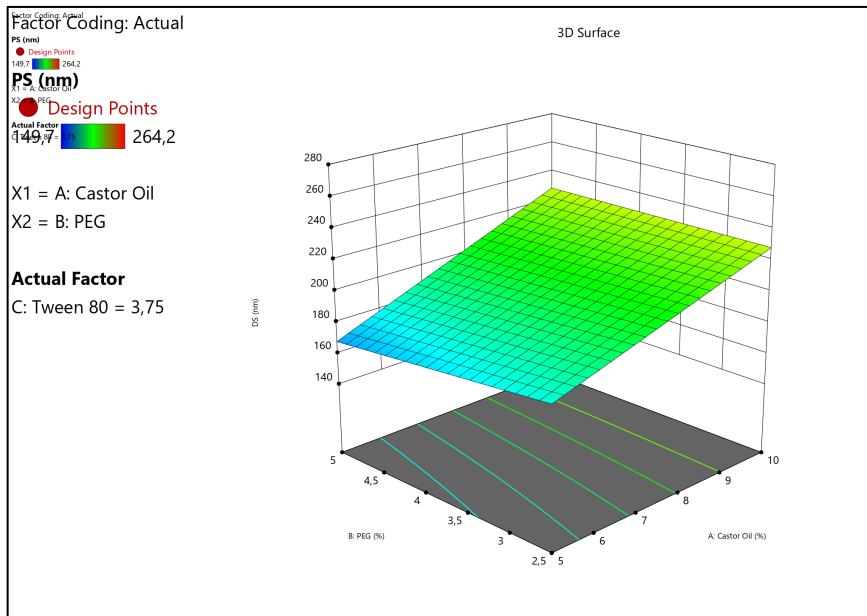
Şekil 4.3. Hint yağı – PEG etkileşim grafiği

Formülasyonda PEG’in düşük miktarda kullanılmasının yanı sıra hint yağının da düşük miktarının kullanılması ile daha düşük damlacık büyüklüğü elde edilebilmektedir. Buna rağmen PEG’in yüksek oranı kullanılıp hint yağının düşük miktarının kullanılması ile damlacık büyüklüğü en düşük seviyesinde elde edilmektedir. PEG’in yüksek veya düşük oranının kullanılması farketmeksizin hint yağının yüksek oranda kullanılması ise damlacık boyutunu benzer seviyede yükseltmektedir.

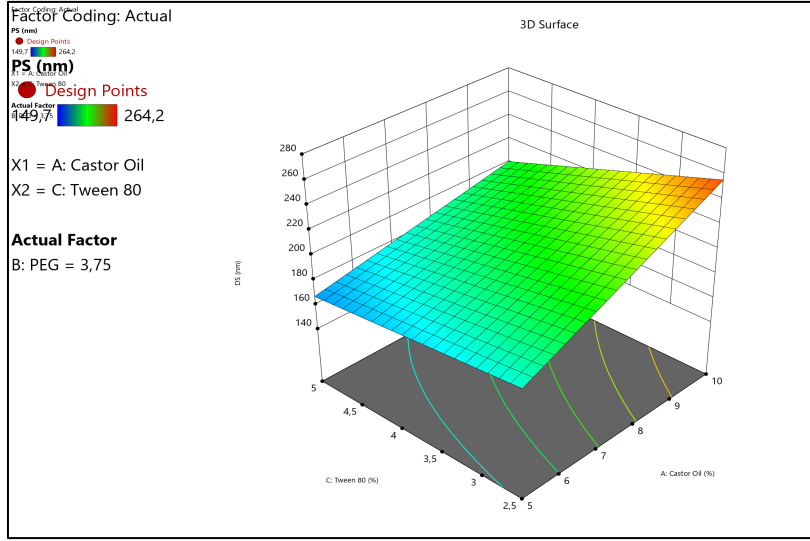


Şekil 4.4. Hint yağı – Tween 80 etkileşim grafiği

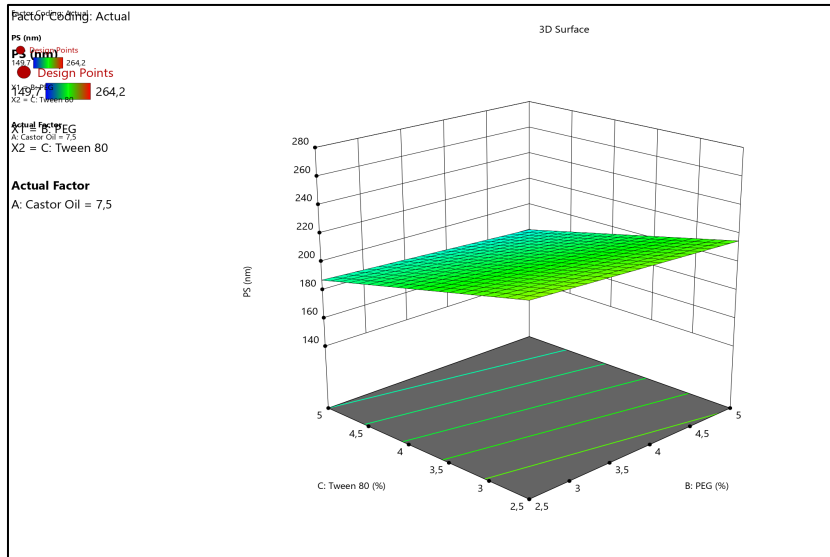
Benzer şekilde hint yağı düşük miktar kullanıldığında Tween 80'in yüksek miktarının kullanılması damlacık büyüklüğünü düşük seviyelere getirmektedir. Formülasyonda hint yağı yüksek oranda kullanılırsa, DS'nin en düşük seviyelerde kalması için Tween 80'in yüksek oranının kullanılması gerekmektedir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.5. Hint yağı – PEG 3D yüzey grafiği (DS)



Şekil 4.6. Hint yağı – Tween 80 3D yüzey grafiği (DS)

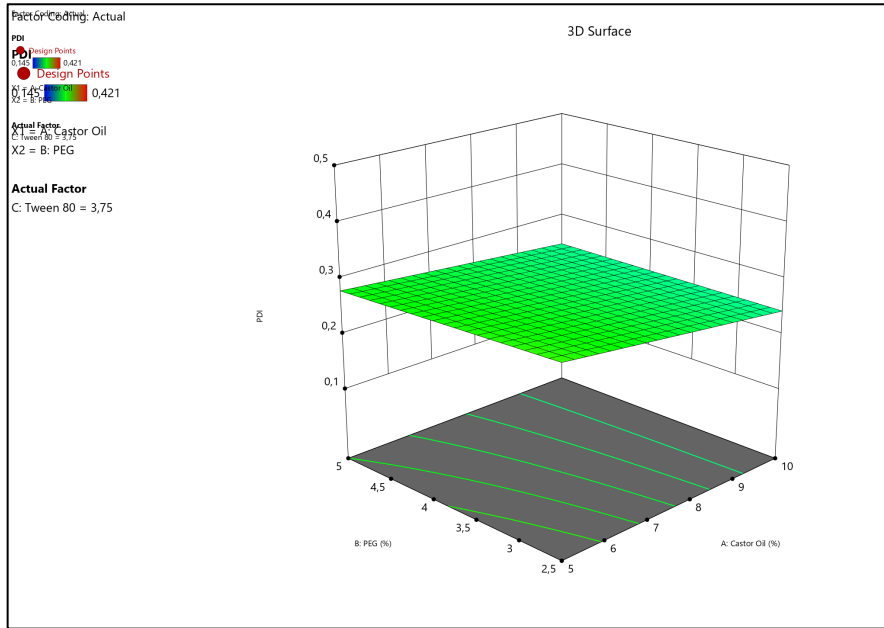


Şekil 4.7. PEG – Tween 80 3D yüzey grafiği (DS)

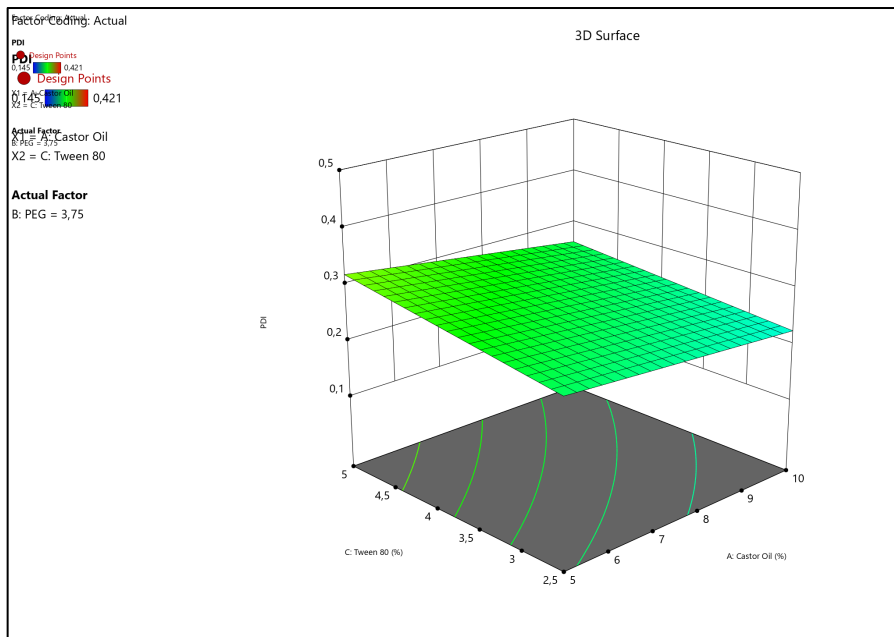
Çizelge 4.16. DS dağılımı için bağımsız değişkenlerin etkileşimleri

| | F-değeri | p-değeri |
|--------------|----------|----------|
| Model | 2,22 | 0,0918 |
| A-Hint Yağı | 5,50 | 0,0315 |
| B-PEG | 0,1868 | 0,6710 |
| C-Tween 80 | 6,75 | 0,0188 |
| AB | 0,2699 | 0,6101 |
| AC | 0,3682 | 0,5520 |
| BC | 0,2434 | 0,6281 |

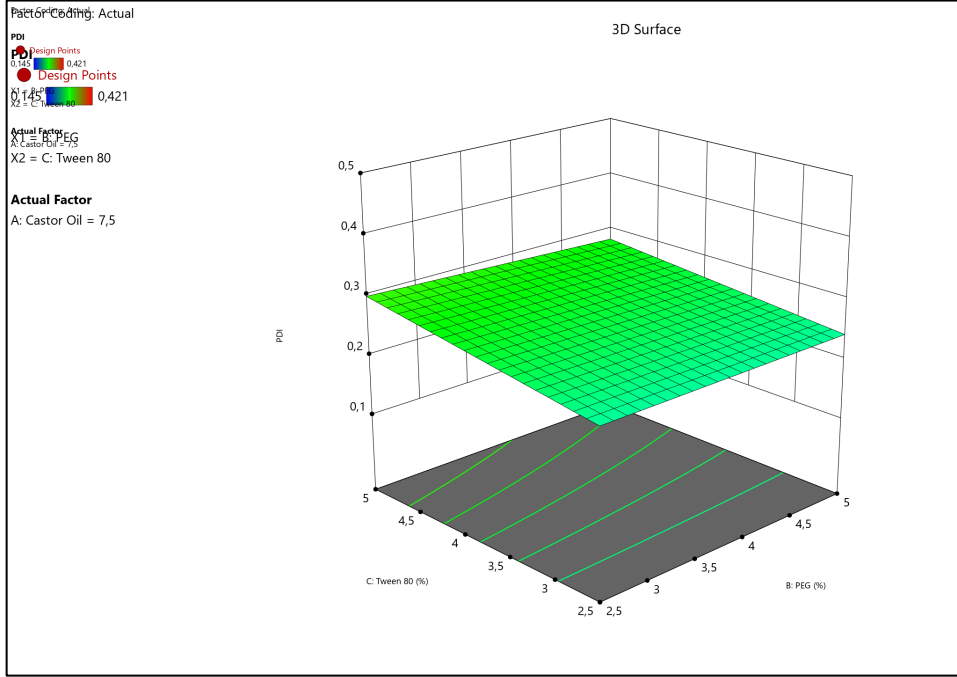
2^3 faktörlü analize göre PDI'nin kullanılan hint yağı ve Tween 80 oranlarına göre anlamlı olarak değiştiği görülmektedir ($p < 0,05$). PEG 400'ün düşük veya yüksek düzeyde kullanılması PDI üzerinde anlamlı bir etkiye sahip değildir ($p > 0,05$). Formülasyon bileşenleri arasında etkileşim gözlenmemiştir (Çizelge 4.16). Damlacık büyüklüğü dağılıma ait 3D yüzey grafikleri Şekil 4.8. – 4.10.'da gösterilmektedir.



Şekil 4.8. Hint yağı – PEG 3D yüzey grafiği (Damlacık büyüklüğü dağılımı)



Şekil 4.9. Hint yağı – Tween 80 3D yüzey grafiği (PDI)



Şekil 4.10. PEG – Tween 80 3D yüzey grafiği (PDI)

Sonuç olarak, formülasyon bileşenlerinin miktarlarının DS ve PDI değerlerine etkisi dikkate alındığında, hint yağı oranı düşük (%5), Tween 80 (%5) ve PEG 400 (%5) oranı yüksek olduğunda optimize edilmiş bir formülasyon hazırlanacağı öngörülmüştür. Bu formülasyon aynı zamanda tasarım yazılımının optimizasyon önerilerinden biridir (Resim 4.1.).



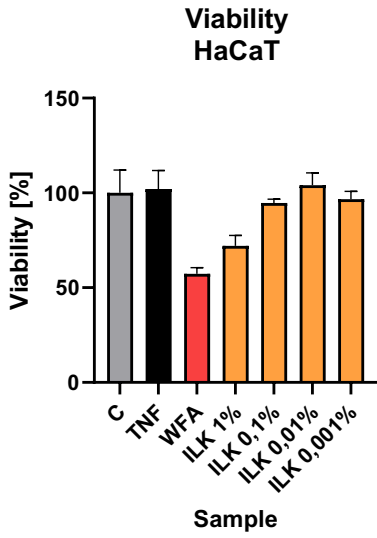
Resim 4.1. Hazırlanan nanoemüljel formülasyonu

4.9. Nanoemüljel Formülasyonunun Cilt Üzerine Etkilerinin Test Edilmesine ait Sonuçlar

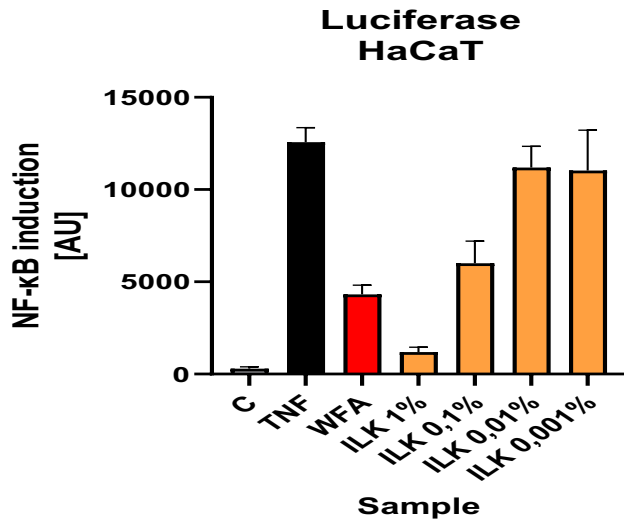
Tez dâhilinde hazırladığımız nanoemüljel formülasyonu, Çizelge 4.17.'de verilen çeşitli sitokinler ve kemokinlere etkileri açısından da keratinositlerde test edilmiştir. Formülasyonun GM-CSF, IL-1 β , IL-1RA, IL-2R, IL-5, -6, -7, -8, -10, -12, -13, -15, -17, 18, TNF- α , CCL5, CCL11 CXCL10 ve CXCL9 ekspresyonuna neden olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.17. Sitokin ve kemokine karşı nanoemüljel formülasyonumuzun cilt rejenerasyonu sağlayıcı ve ciltteki enflamasyona karşı etkisi

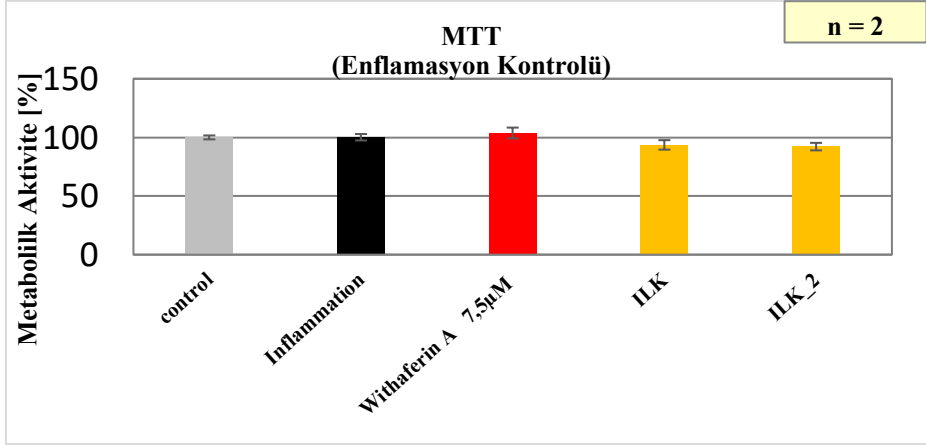
| İsim | Tip | Keratinosit ekspresyonu | Fonksiyon |
|-----------------------|---------|-------------------------|----------------------------------|
| GM-CSF | Sitokin | + | Ten rengi/yara iyileşmesi |
| IFN- α | Sitokin | - | Doğuştan bağışıklık |
| IFN- γ | Sitokin | - | Doğuştan ve adaptif bağışıklık |
| IL-1 β | Sitokin | + | Pro-enflamatuvar |
| IL-1RA | Sitokin | + | Pro-enflamatuvar |
| IL-2 | Sitokin | - | İmmünomodülatör |
| IL-2R | Sitokin | + | İmmünomodülatör |
| IL-4 | Sitokin | - | İmmünomodülatör |
| IL-5 | Sitokin | + | İmmünomodülatör |
| IL-6 | Sitokin | + | Pro-enflamatuvar |
| IL-7 | Sitokin | + | İmmünomodülatör |
| IL-8 | Sitokin | + | Pro-enflamatuvar |
| IL-10 | Sitokin | + | İmmünomodülatör |
| IL-12 (p40/p70) | Sitokin | + | İmmünomodülatör |
| IL-13 | Sitokin | + | İmmünomodülatör |
| IL-15 | Sitokin | + | İmmünomodülatör |
| IL-17 | Sitokin | + | Pro-enflamatuvar |
| TNF- α | Sitokin | + | Pro-enflamatuvar |
| Eotaksin (CCL11) | Kemokin | + | Yara iyileşmesi |
| IP-10 (CXCL10) | Kemokin | + | İmmünomodülatör |
| MCP-1 (CCL2) | Kemokin | + | Pro-enflamatuvar/yara iyileşmesi |
| MIG (CXCL9) | Kemokin | + | Enflamatuvar |
| MIP-1 α (CCL3) | Kemokin | - | Enflamatuvar |
| MIP-1 β (CCL4) | Kemokin | - | Enflamatuvar |
| RANTES (CCL5) | Kemokin | + | Enflamatuvar |
| IL-18 | Sitokin | + | Hassasiyet |



Şekil 4.11. Nanoemüljel formülasyonumuzun 2D modelinde canlılık testi sonuçları (WFA: Withaferin A, ILK: Nanoemüljel formülasyonu)

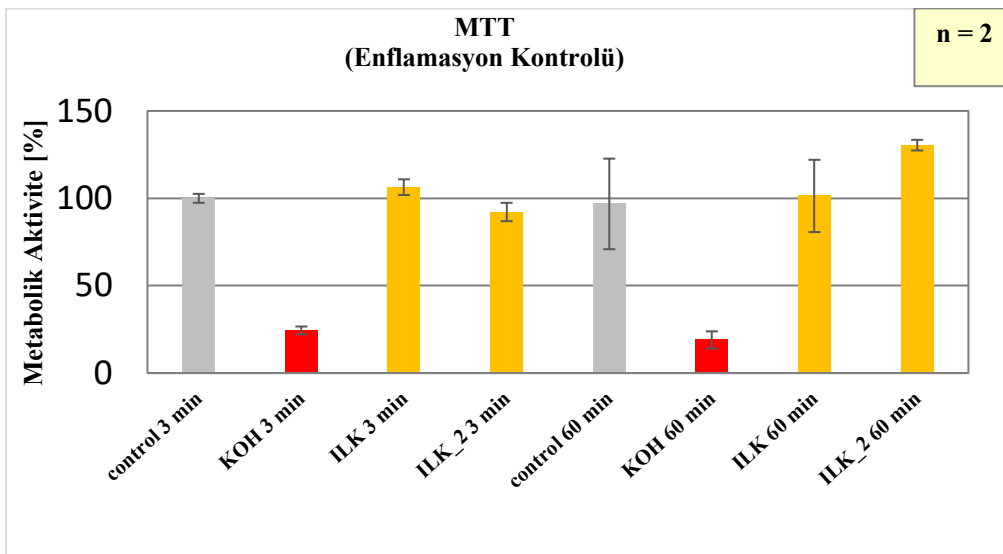


Şekil 4.12. Nanoemüljel formülasyonumuzun anti-enflamatuvar potansiyeli (WFA: Withaferin A, ILK: Nanoemüljel formülasyonu)



Şekil 4.13. Nanoemüljel formülasyonumuzun EpiC'lerle 3D modelde canlılık (Epidermis Modeli, 6 saatlik tedaviden sonra) testi sonuçları (WFA: Withaferin A, ILK: Nanoemüljel formülasyonu)

Şekil 4.11'de gösterildiği gibi %1'lik bir konsantrasyonda (ortamdaki çözünme sorunları nedeniyle test edilen en yüksek konsantrasyon) HaCaT canlılığında bir azalma olduğu görülmüştür. Lusiferaz tahlilinde, nanoemüljelin yüksek anti-enflamatuvar etkisi, NF- κ B'nin azaltılması yoluyla, %0,1 nihai hacimdeki numune konsantrasyonunda neredeyse %50 oranında görülmüştür. (Şekil 4.12.). Nanoemüljelin canlılık üzerindeki etkisi EpiC'lerle 3D Modelde test edilmiştir. 6 saatlik tedavi sonrası metabolik aktivite üzerinde herhangi bir etki gözlenmemiştir ve numune herhangi bir zarar verici etkiye neden olmamıştır (Şekil 4.13.). Sonuç olarak nanoemüljel formülasyonumuzun zarar verici bir etki göstermediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.14. Korozyon testi (OECD kılavuzu) (KOH: Potasyum hidroksit, ILK: Nanoemüljel formülasyonu)

OECD kılavuzuna göre (3 dk ve 1 saat) ciltte geri dönüşü olmayan bir hasar yaratmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14).

5. TARTIŞMA

Son yıllarda, tüketicilerin doğal kaynaklardan elde edilen kozmetik ürünlere olan talebi dolayısıyla alternatif etken madde arayışlarına yönelik çalışmalar artmıştır. Fenolik bileşikler, geniş bir biyoaktivite yelpazesine sahiptir ve bu durum onları bu kozmetik ürünlerin geliştirilmesi için ideal adaylar haline getirmiştir.

Melanin pigmenti, cildi UV ışınlarının zararlı etkilerinden korusa da aşırı üretimi ve birikmesi; hiperpigmentasyon, post-enflamatuvar pigmentasyon, melazma ve cilt yaşlanması gibi durumlara neden olmaktadır. Bunların yanı sıra gıdaların renklerinin koyulaşarak kalitelerinin düşmesine de yol açmaktadır. Melanin, cilt renginden sorumlu ana pigmenttir. Bununla birlikte, melanin üretiminden sorumlu olan TYR'nın aşırı üretimi olduğunda, cilt hiperpigmentasyonuna neden olur ve bu da açık ila koyu kahverengi lekeler, yüz, boyun ve gövdede düzensiz gri lekeler ve solgunluk gibi daha koyu bir cilt görünümüne yol açar.

Funguslar, bitkiler ve hayvanlar olmak üzere birçok organizmada bulunan ve deriye rengini veren melanin pigmentinin biosentezinde anahtar enzim olarak TYR yer almaktadır. Melanin oluşumunu azaltabilen veya engelleyebilen TYR inhibitör ajanları tıp, kozmetik ve gıda endüstrilerinde yoğun ilgi görmektedir. TYR inhibitörleri arasında en yaygın olarak kullanılanların başında α -kojik asit gelmektedir. Fakat α -kojik asitin stabilite problemleri ile ciltte irritasyon, hassasiyet, dermatit gibi yan etkileri ve karsinojen etkilerinden dolayı kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle stabilite problemi olmayan, daha güvenli ve daha etkili yeni TYR inhibitörlerine halen ihtiyaç vardır.

Elastin; aort, akciğer, kıkırdak, elastik bağlar ve cilt gibi bağ dokularına esneklik sağlayan hücre dışı bir matris proteindir. Elastin, kolajenden kabaca 1000 kat daha esnektir; bu nedenle elastinin ana işlevi tam olarak dokuların esnekliğidir. Elastin; vasküler düz kas hücreleri ve fibroblastlar tarafından sentezlenir ve salgılanır. Bu süreç normalde vücut olgunluğa eriştiğinde ergenlikten hemen sonra durur. Kolajene ek olarak, cildin elastikiyetini ve sıkılığını korumak için elastin üretilir. Bununla birlikte, elastin liflerindeki azalma, elastaz enziminin aşırı üretilmesinden kaynaklanır ve ardından mekanik doku özelliklerini azaltır. Kolajen, insanlarda bulunan en bol proteindir ve dermisin birincil yapısal bileşeni olarak,

insan cildine güç ve destek vermenin yanı sıra cilt elastikiyetini ve esnekliğini geri kazandırmaktan sorumludur. Normal ciltte, cildin elastikiyetini ve sıkılığını korumak için kolajen tekrar tekrar üretilir ve parçalanır. Bununla birlikte, genel olarak, kolajendeki azalma, matris-metaloproteazların ve kolajenaz enzimlerinin aşırı üretilmesinden kaynaklanır (Gokce, 2023).

Cilt yaşlanması karşıtı ve cilt rengini açıcı kozmetik ürünlere olan talep nedeniyle bu pazara ilgi artış göstermektedir. Bu nedenle, cilt yaşlanmasını ve lekelenmesini giderici maddeler üzerine yapılan araştırmalar, popüler araştırma alanlarından. Cildin belirli bir bölgesinde anormal melanin birikmesi estetik soruna neden olmaktadır. Doğal kaynaklar olarak bitkilerden, mantar türlerinden ve deniz alglerinden elde edilen TYR inhibitörleri, kozmetik talep nedeniyle genellikle kimyasal olarak sentezlenmiş bileşiklerden daha fazla ilgi görmektedir. Bununla birlikte, sitotoksikite, çözünürlük, etkili kutanöz absorpsiyon vb. gibi diğer parametreler nedeniyle pratikte yalnızca birkaç doğal inhibitör kozmetik olarak kullanıma girmiştir. Bu nedenle birçok doğal inhibitör, yarı sentetik analoglara dönüştürülmekte ve birçok sentetik yeni yapısal iskelete sahip TYR inhibitörleri tasarlanmaktadır. Pek çok sentetik inhibitör mükemmel mantar TYR inhibitör aktivitesi sergilemesine rağmen, bunlardan çok azı hücresel sistemlerde veya deri modellerinde melanogenez inhibisyon aktivitesi göstermektedir. Bu nedenle yakın zamanda keşfedilen sentetik TYR inhibitörlerinin birincil hedefi, hücre-bazlı analizde uygun inhibitör aktiviteye ulaşmaktır.

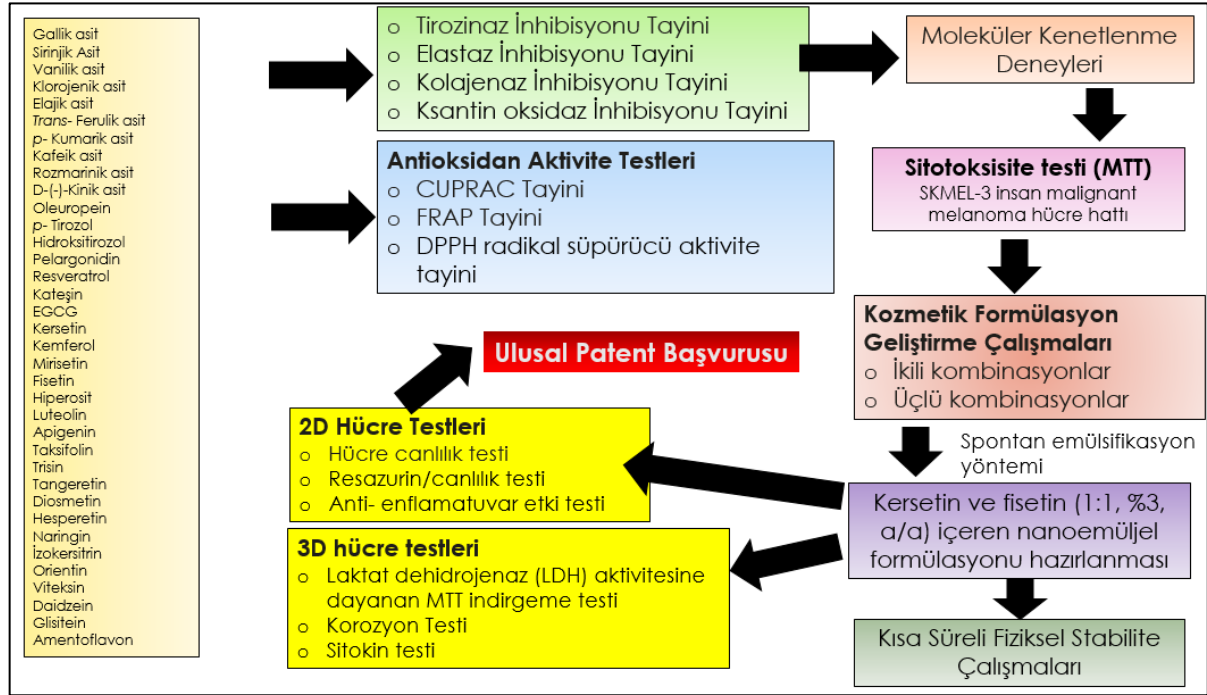
Hem sentetik hem de doğal kökenli yeni TYR inhibitör bileşiklerinin keşfine yönelik kapsamlı araştırmalar olmasına rağmen, mevcut TYR inhibitörlerinin sayısı oldukça sınırlı olup, özellikle kozmetik sektöründe yeni inhibitörlere ihtiyaç duyulmaktadır (Orhan ve diğerleri 2015). Hidrokinon, kojik asit ve arbutin gibi en yaygın olarak kullanılan TYR enzim inhibitör ajanlarından bazıları tatmin edici sonuçlar vermemekte ve ciddi yan etkilere neden olabilmektedir (Muchtaridi ve Dewi, 2020; Shim ve diğerleri, 2017). Arbutin cilt rengini açıcı bir ajan olarak ve hiperpigmentasyon bozukluklarının tedavisi için umut vaat etse de kullanımıyla ilişkili güvenlik endişeleri ve olası yan etkiler, güvenli ve etkili bir şekilde uygulanmasını sağlamak için daha fazla araştırma ve kapsamlı değerlendirmeyi gerektirmektedir.

Kozmetik pazarında halihazırda kullanılmakta olan TYR inhibitörleri ile ilgili yan etki bildirimleri oldukça fazladır. Yakın zamanda bildirilen en çarpıcı vakalardan biri, *Acer nikoense* (Miq.) Maxim. bitkisinden izole edilmiş doğal bir bileşik olan 4-(4-hidroksifenil)-2-butanoldür. 2008'den beri kozmetikte cilt beyazlatıcı bir bileşen olarak tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu bileşiği içeren kozmetik ürünleri kullanan önemli sayıda tüketici, ciltlerinde lökoderma problemi yaşadığından, 2013 yılında bu bileşiği taşıyan cilt rengini açıcı kozmetik ürünler geri çekilmiştir (Lee ve diğerleri, 2016). Bu nedenle hiperpigmentasyon bozukluklarının tedavisi için yeni bileşiklerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Cela-López ve diğerleri, 2021).

“Bitkisel Kökenli Bazı Fenolik Bileşiklerin *In Vitro* ve *In Silico* Deney Modelleri ile Cilt Lekesi Giderici Etkilerinin İncelenmesi ve Kozmetik Formülasyon Tasarlanması” başlıklı tezimizde, bitkilerde yaygın bulunduğu bilinen ve kozmetik ürünlerde de yer alan fenolik bileşiklerin farklı kimyasal gruplarından 36 adet fenolik bileşik seçilmiş, cilt lekelerini açıcı ve kırışıklık karşıtı etkileri TYR, elastaz, kolajenaz ve XO'a karşı enzim inhibisyonu deneyleri ile *in vitro* olarak tayin edilmiştir. Fenolik bileşikler, 3 ayrı yöntem ile antioksidan aktiviteleri açısından da test edilmiştir. Zira birçok doğal kaynaklı fenolik bileşik, güçlü antioksidan etkileri nedeniyle kozmetik ürün formülasyonlarında yer almaktadır. Nanoemüljel formülasyonumuzun etken maddelerini oluşturan kersetin ve fisetin, antioksidan aktivite testlerimizde de yüksek etkinlik göstermiştir (Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10). Oksidan bir enzim olan XO'a karşı, 10 mM konsantrasyonda fisetin inhibitör etki ($77,12 \pm 1,89$, IC_{50} : $5,25 \pm 0,10$ mM) gösterirken, kersetinin inhibitör etkisi ($28,15 \pm 1,09$) düşük bulunmuştur. Ancak daha önceki çalışmamızda, 25 mg/mL konsantrasyonda test edildiğinde kersetin XO'ı % 98, $03 \pm 2,34$ oranında inhibe etmiştir (Baki Kekilli ve diğerleri, 2021). Bu tez çalışmasında kersetinin daha düşük etki göstermesinin sebebi, konsantrasyonun çok daha düşük olması ile açıklanabilir.

Daha sonra TYR'ı etkili şekilde inhibe ettiği belirlenen fenolik bileşiklerin *in silico* ortamda TYR ile moleküler kenetlenme modellemeleri simüle edilmiş ve özellikle enzimin aktif bölgesinde bulunan bakır atomlarıyla etkileştikleri saptanmıştır. Seçilen fenolik bileşikler, SKMEL-3 insan malignant melanoma hücre hattında çok düşük sitotoksisite göstermiştir. Tezimizin ana amacının cilt rengini açıcı kozmetik formülasyon hazırlanması olduğundan, ön taramamızda TYR'ın aktif inhibitörü olduğunu belirlediğimiz 4 adet fenolik bileşikten hareketle, ikili ve üçlü kombinasyonlar oluşturulmuş ve TYR'a karşı tekrar test edilmiştir.

TYR ve elastaz inhibitörü etkileri açısından en yüksek etkiyi göstermeleri nedeniyle, en uygun kombinasyon olduğuna karar verilen fisetin: kersetin (1:1) içeren nanoemüljel formülasyonu hazırlanmıştır. Nanoemüljel formülasyonu, Avusturya İlaç Araştırma Enstitüsünde (Austrian Drug Screening Institute, ADSI) bulunan kozmetik laboratuvarında iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) deneysel modeller ile test edilmiştir. 2D modelleri ile HaCaT keratinosit hücrelerinde hücre canlılığına etkisi ile lusiferaz yöntemi ile NF-κB indüksiyonu üzerinden anti-enflamatuvar etkisi incelenen nanoemüljel formülasyonunun cilt üzerine korozyon etkisi 3D cilt modelleri ile yeniden yapılandırılmış insan epidermis hücreleri üzerinde EpiCS® yöntemi ile incelenmiştir. Anti-enflamatuvar aktivite potansiyelinin saptanması için nanoemüljel formülasyonunun cilt rejenerasyonu üzerine etkisi, xMAP Luminex teknolojisi ile çeşitli sitokinler ve kemokinlere karşı incelenmiştir. Nanoemüljel formülasyonumuz üzerinde kısa süreli (3 ay) stabilite çalışması da gerçekleştirilmiştir. Tezimiz kapsamında yapılan tüm deneysel çalışmalar, Şekil 5.1’de sunulmuştur.



Şekil 5.1. Tezimiz kapsamında yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi

Tezimizin hedefi olan cilt rengini açıcı kozmetik formülasyonu, nanoemüljel olarak geliştirilmiş, kısa süreli stabilite çalışmamızda, 3 ay boyunca formülasyonun stabil olduğu gözlenmiştir. Nanoemüljel formülasyonumuz, deri biyolojisi ve farklılaşma çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir insan keratinosit hücre hattı olan HaCat hücre hattı kullanılarak

2D canlılık (viability) modelinde, *Withania somnifera*'nın (L.) Dunal yapraklarından izole edilen steroidal bir lakton ve sitotoksik bir molekül olan withaferin A (WFA) ile mukayese edildiğinde, özellikle % 0,001; % 0,01 ve % 0,1 arasında test edilen oranlarda keratinosit canlılığını bozmadığı; %1 oranında formülasyona maruz bırakılan keratinositlerin de %65 civarında canlılıklarını koruduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11). 2D modeli lusiferaz enzimatik testi ile yine HaCat hücre hattında nanoemüljel formülasyonumuzun anti-enflamatuvar etkinliği NF- κ B indüksiyonu üzerinden, WFA ile mukayese edilmiştir. Zira WFA'nın farklı hücre tiplerinde, çeşitli pro-enflamatuvar ve stres yanıt aracılarının ekspresyonunu kontrol eden çok yönlü bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen NF- κ B aktivitesini inhibe ettiği tanımlanmıştır. Lusiferaz enzimatik deneyi ise, lusiferaz enziminin aktivitesini ölçmek için moleküler biyoloji ve biyokimyada kullanılan yaygın bir yöntemdir. Lusiferaz, lusiferinin oksidasyonunu katalize ederek ışık yayılmasına neden olur. Bu testte, yayılan ışık miktarı numunede bulunan lusiferaz aktivitesi ile doğru orantılıdır ve raportör gen tahlilleri, ATP tespiti ve gen ekspresyon seviyelerinin izlenmesi dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Hassas ve çok yönlü bir teknik olması bu testi araştırma ve teşhis alanlarında değerli kılmaktadır. Nanoemüljel formülasyonumuzun, bu deneyde HaCat hücrelerine % 1 oranında maruz bırakıldığında, NF- κ B aktivitesini WFA'ya göre daha yüksek oranda inhibe ettiği saptanmıştır (Şekil 4.12). Ayrıca % 0,1 oranındaki örnek konsantrasyonunda da NF- κ B aktivitesi yaklaşık % 50 azalmıştır. Bu da nanoemüljel formülasyonumuzun anti-enflamatuvar etkinliğe sahip olduğuna işaret etmektedir.

Tek tabakalı deri hücre kültürleri (keratinositler, fibroblastlar, melanositler, vb.) çeşitli bileşiklerin terapötik veya dermo-kozmetik hedefe yönelik olarak değerlendirilmesi için özellikle büyük ölçekli tarama çalışmalarında çok fayda sağlamaktadır. Bunların kullanım maliyeti düşük ve yöntemsel olarak daha basit olmalarına rağmen, bazı sınırlamalar mevcuttur. Örneğin, tek tabakada farklılaşmış keratinosit kültürü, aktif keratinositlerin etkisini değerlendirmek için uygun değildir. Bileşikler, stratum corneum'a ihtiyaç duyan epidermisin bariyer işlevi üzerinde etkilidir. Ayrıca, bitmiş ürünlerle veya yağda çözünür bileşiklerle topikal temas için uygun değildir. Bu nedenle, cilt fizyolojisine daha yakın, epidermal farklılaşma ve tabakalaşmayı temsil eden ve pre-klinik aşamadaki aktif bileşenler için kozmetik nesnelleştirme veya toksikolojik değerlendirme amacıyla daha öngörücü olan modellere gerçek bir ihtiyaç vardır. Bugün bildiğimiz şekliyle 3D yeniden yapılandırılmış cilt modellerinin başlangıcı James Rheinwald ve 1970'lerin sonunda Howard Green, 3T3

murin fibroblast desteği üzerinde bir keratinosit tabakası üretmeyi ilk kez başarmıştır. Bununla birlikte, model o zamanda deriyi pek temsil etmemektedir. İşlevsel bir stratum korneuma sahip ilk epidermal model Michel Prunieras ve ekibi tarafından 1979 yılında aselüler bir dermal matriks üzerinde bir emersiyon keratinosit kültürü temelinde yayınlanmıştır. Bugüne kadar, endüstriyel ölçekli testlerle uyumlu olan; yeniden yapılandırılmış insan epidermisi (re-structured human epidermis, RHE), insan derisi eşdeğeri (huma skin equivalent, HSE) ve ameliyat sırasında insan derisinden alınan insan derisi eksplantı olmak üzere 3 tip 3D cilt modeli bulunmaktadır. RHE'ler (EpiSkin/SkinEthic, EpiDerm/MatTek, epiCS/CellSystems, EPI001/StratiCELL, EPI-model/LabCyte, vb.) çoğunlukla polikarbonat membranlar üzerine yerleştirilmiş farklı boyutlardaki kültür eklerinde, yüksek oranda standardize edilmiş protokoller kullanılarak üretilmektedir. Makul bir birim maliyet avantajına sahiptirler ve çok sayıda tedarikçi firmadan ticari olarak temin edilebilmeleri mümkündür. Nanoemüljel formülasyonumuz, RHE-temelli EpiCS® 3D epidermal deri modelinde test edilmiş olup, canlılık testi sonuçlarına göre; 6 saatlik maruziyetten sonra nanoemüljel formülasyonumuzun epidermiste metabolik aktiviteyi uyarmadığı yani herhangi bir zarar vermediği gözlenmiştir.

Cilt korozyonu, bir test kimyasalının uygulanmasını takiben epidermis ve dermis boyunca gözle görülür nekroz olarak ortaya çıkan ciltte geri dönüşü olmayan hasar oluşumunu ifade eder. *In vitro* cilt korozyon testi, hayvanların acı ve ıstırabını önleyen cilt korozyon testi için hayvan kullanımına alternatif olarak kabul edilmektedir. Bu test, aynı zamanda insan sağlığını ilgilendiren cilt korozyonuna yöneliktir. Ekonomik İş Birliđi ve Kalkınma Teşkilatı (The Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) korozyon testinde OECD431), insan derisinin üst kısımlarının, yani epiderminin histolojik, morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerini yakından taklit eden yeniden yapılandırılmış insan epidermisi, insan kaynaklı dönüştürülmemiş epidermal keratinositlerden elde edilerek kullanılır. *In vitro* deri korozyonu çalışması, Birleşmiş Milletler Küresel Uyumlaştırılmış Kimyasalların Sınıflandırılması ve Etiketlenmesi Sistemine (BM GHS) uygun olarak RHE dokusu kullanılarak kimyasalların korozif olmayan ve korozif potansiyelini belirlemek için gerçekleştirilir. Bu test yöntemi hem maddeler hem de karışımlar için çok çeşitli kimyasal sınıflarına ve fiziksel durumlara uygulanabilir. Çalışmalarda OECD 431'e uygun olarak doğrulamak için bilinen cilt aşındırıcı özelliklerine sahip 15 farklı aşındırıcı (korozif) ve aşındırıcı olmayan non-korozif) kimyasal kullanarak çeşitli doğrulama deneyleri gerçekleştirilmektedir. Her bir kimyasal, 3 dk ve 60 dk'lık süre boyunca 3 doku örneği

üzerine topikal olarak uygulanır. Tedavi süresinin sonunda, sitotoksisite MTT Testi kullanılarak belirlenir. MTT indirgeyici kimyasallar için uyarlanmış kontroller kullanılır. Nanojel formülasyonumuz korozif ajan olarak KOH kullanılmak suretiyle, RHE-temelli OECD 431 testine tabi tutulmuş, 3 dk ve 60 dk'lık süre boyunca herhangi bir geri dönüşümsüz korozyon saptanmamıştır.

Nanoemüljel formülasyonumuz, keratinositlerde çeşitli sitokinler ve kemokinlere etkileri açısından da incelenmiştir. IL'ler ve kemokinler, keratinositler gibi hücrelerde ifade edildiğinde, bu durum, söz konusu hücrelerin çevresel koşullara yanıt olarak bu sitokinleri ürettiği anlamına gelir. IL'ler, bağışıklık sistemi hücrelerinin etkileşimini düzenleyen proteinlerdir ve enflamasyon, enfeksiyon ve doku onarımı gibi birçok biyolojik süreçte önemli rol oynarlar. Kemokinler ise hücreler arası sinyal iletiminde önemli olan küçük proteinlerdir ve bağışıklık hücrelerini enfeksiyon odaklarına çekerler. Bu süreçler, hücreler arası iletişimi ve bağışıklık tepkilerini düzenlemede kritik öneme sahiptir.

Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), 2 potansiyel N-bağlı glikozilasyon bölgesine sahip 127 amino asitten oluşan bir glikoprotein olup, genellikle enflamatuvar bir sitokin olarak kabul edilmektedir (Bhattacharya ve diğerleri, 2015). Enflamatuvar aktivitesi, öncelikle granülosit ve makrofaj popülasyonları için bir büyüme ve farklılaşma faktörü olarak rol oynamasından kaynaklanmaktadır (Ponomarev ve diğerleri, 2007). GM-CSF makrofajlar, endotel hücreleri, alveolar epitel hücreleri ve T hücreleri dahil olmak üzere farklı hücreler tarafından üretilen immünmodülatör bir sitokin olarak da bilinmektedir. IL-1, IL-2, TNF- α ve interferon-gama (IFN- γ) gibi enflamatuvar sitokinler, GM-CSF üretimini ve salgılanmasını tetikleyebilirken, IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta (transforming growth factor-beta, TGF β) gibi bağışıklık düzenleyici sitokinler üretimini baskılayabilir. GM-CSF, immünoregülatör bir sitokin olarak hareket ederek immünolojik toleransı teşvik eder. Nanoemüljel formülasyonumuz tarafından, GM-CSF'in keratoinositlerde ifade edildiği gösterilmiştir (Çizelge 4.17). Nanoemüljel formülasyonumuz GM-CSF'in yanısıra, IL-1 β , IL-1RA, IL-2R, IL-5-, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 ve TNF- α gibi sitokinler ile eotaksin (CCL11), IP-10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIG (CXCL9) ve RANTES (CCL5) adlı kemokinlerin keratoinositlerde ifade edilmesine yol açmıştır. "Eozinofil kemotaktik protein" veya "eotaksin-1" olarak da bilinen C-C motifli kemokin 11, insanlarda CCL11 geni tarafından kodlanan bir proteindir.

Bu deneyde, söz konusu sitokinler ile kemokinlerin keratinositlerde ifade edilmesi, nanoemüljel formülasyonumuzun keratinositlerde IL'ler ve kemokinler gibi bağışıklık sistemi sinyal moleküllerinin üretimini arttırdığı anlamına gelmektedir. Bu, keratinositlerin bağışıklık tepkisine daha aktif bir şekilde katıldığı ve bu sitokinler aracılığıyla bağışıklık sistemi hücrelerini hedef alan enfeksiyonlara ve enflamasyonlara karşı bir yanıt gösterdiğine işaret etmektedir. Dolayısıyla nanoemüljel formülasyonumuzun anti-enflamatuvar etkinliği bu mekanizma üzerinden de gösterilmiştir.

Sonuç olarak; "Bitkisel Kökenli Bazı Fenolik Bileşiklerin *In Vitro* ve *In Silico* Deney Modelleri ile Cilt Lekesi Giderici Etkilerinin İncelenmesi ve Kozmetik Formülasyon Tasarlanması" başlıklı doktora tez çalışmamızda seçilen fenolik bileşiklerden hareketle, *in vitro*, *in silico* ve hücresel modeller kullanılarak formülasyonda yer alan kersetin ve fisetinin cilt rengini açıcı etkinliği kanıtlanmış, nanoemüljel formunda bitmiş ürün prototipi hazırlanmış ve stabilite çalışması yapılmıştır. Tezimizin hedefi olan kozmetik ürün formülasyonu geliştirilmiş ve ulusal patent başvurusu da yapılmıştır. Zira bu prototip, dünyada fisetin ve kersetinin 1:1 oranında kombinasyonundan oluşan cilt rengini açıcı ilk formülasyon olup, araştırmalarımıza göre henüz dünyada ve ülkemizde bir muadili bulunmamaktadır. Nanoemüljel formülasyonumuzun anti-enflamatuvar etkiye sahip, sitotoksiste ve kozrozyon testlerine göre de güvenli olması bir avantaj olarak düşünülmektedir. Ayrıca tez çalışmamız, Farmakognozi alanında kozmetik konusunda araştırma yaparak prototip ürün çıktısı elde edilen ve patent başvurusunda bulunan Anabilim Dalımızda tamamlanan 3. doktora tezi olmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Cilt rengini açıcı ve hiperpigmentasyon ile ilgili cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılan, doğal veya sentetik kaynaklı TYR inhibitörleri mevcut olmasına rağmen, bazılarının istenmeyen etkileri ve toksisite riskleri nedeniyle yeni, etkili ve daha güvenli TYR inhibitörleri bulunmasına yönelik araştırmalar sürdürülmektedir. Ayrıca bazı hiperpigmentasyon durumlarında, zamanla direnç gelişebilir ve mevcut tedavilere yanıt azalabilir. Yeni moleküller, direnç gelişimini engellemek veya mevcut dirençli durumları tedavi etmek için de gerekebilir. Farklı moleküller, değişik pigmentasyon mekanizmalarını hedefleyebilir veya mevcut tedavilerin etkili olmadığı belirli pigmentasyon tiplerini hedefleyebilir. Bu nedenlerle hem dermatolojik hem de kozmetik/estetik sebeplerle cilt rengini açan ve leke gideren ürünlere ve etken maddelere ihtiyaç halen mevcuttur.

Ülkemizde kozmetik sektörü gelişen ve ticaret hacmi artan bir trend göstermesine rağmen, kozmetik alanında Ar-Ge ve üretme-geliştirme (Ür-Ge) çalışmaları istenen seviyede değildir. Özellikle dermokozmetik veya kozmesötik olarak bilinen ürün grubunda ülkemiz ağırlıklı olarak ithalata dayalıdır. Bu nedenle doktora tez çalışmamız kapsamında taahhüt edilen, bilimsel olarak etkinliği gösterilmiş ve hazırlanmış olan nanoemülsiyon formülasyonu hazırlanmış ve prototip ürün elde edilmiştir. Şu anda dünyada muadili bulunmaması nedeniyle özgün bir formülasyon olan prototip ürünümüz için ulusal patent başvurusunda da bulunulmuştur.

Ayrıca tez çalışmasının sonrasında, formülasyonunun fotoprotektif etkisinin *in vivo* deney modelinde çalışılması planlanmış ve bu amaçla Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri BAP) birimi tarafından proje desteği alınmıştır. Adıgeçen proje sonunda da nanoemülsiyonumuzun fotoprotektif etkinliğinin kanıtlanması durumunda, yine patent başvurusunda bulunulacaktır.

Bu doktora çalışmasından elde edilen çıktılar ve cilt rengini açıcı özellikteki prototip ürün ile Türk kozmetik sektörünün ihtiyacı olan Ar-Ge çalışmalarına ve üniversite-sanayi iş birliğine daha fazla katkıda bulunulabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abbas, S., Alam, S., Singh, K. P., Kumar, M., Gupta, S., Ansari, K. M. (2017). Aryl hydrocarbon receptor activation contributes to benzanthrone-induced hyperpigmentation via modulation of melanogenic signaling pathways. *Chemical Research in Toxicology*, 30(2), 625-634. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00364>
- Abd, E., Benson, H. A. E., Roberts, M. S., Grice, J. E. (2018). Follicular penetration of caffeine from topically applied nanoemulsion formulations containing penetration enhancers: *in vitro* human skin studies. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(5), 252-260. <https://doi.org/10.1159/000489857>
- Addor, F. A. S. (2017). Antioxidants in dermatology. *Anais Brasileiros De Dermatologia*, 92(3), 356-362. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175697>
- Ahmad, S., Shabbir, A., Tareen, N., Ahmad, S., Chohan, M. A. (2022). Plant-derived bioactive compounds as skin photoprotection agents. *International Journal of Natural Medicine and Health Sciences*, 1(2), 46-55. <https://doi.org/10.52461/ijnms.v1i2.866>
- Ahmed, Q. U., Alhassan, A. M., Khatib, A., Hasan, M. M., Sarian, M. N. (2018). Antiradical and xanthine oxidase inhibitory activity evaluations of *Averrhoa bilimbi* L. leaves and tentative identification of bioactive constituents through LC-QTOF-MS/MS and molecular docking approach. *Antioxidants*, 7(10), 137. <https://doi.org/10.3390/antiox7100137>
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Al-Edresi, S., Baie, S. (2009). Formulation and stability of whitening VCO-in-water nano-cream. *International Journal of Pharmaceutics*, 373, 174-217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.02.011>
- Aliyazıcıoğlu, R., Şener, S., Korkmaz, N., Akkaya, S., Özgen, U., Karaoğlu, Ş. A. (2018). *Clinopodium vulgare* L. subsp. *vulgare* ekstresinin antioksidan, antimikrobial, tirozinaz inhibitor aktiviteleri ve RP-HPLC ile fenolik bileşiklerinin araştırılması. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. <https://doi.org/10.17714/gumusfenbil.306925>
- Ando, H., Kondoh, H., Ichihashi, M., Hearing, V. J. (2007). Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis *via* the quality control of tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 751-761. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700683>
- Ankur Gupta, H., Burak Eral, T., Hatton, A., Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, 12, 2826-2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>

- Apone, F., Barbulova, A., Colucci, M. G. (2019). Plant and microalgae derived peptides are advantageously employed as bioactive compounds in cosmetics. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00756>
- Arslan, Y. T. (2022). Güneş ışınlarının cilt üzerindeki etkileri ve fotoyaşlanma. *Tıpta Yenilikçi Yaklaşımlar Dergisi*, 3(1), 20-27. <https://doi.org/10.29329/jiam.2022.455.2>
- Ashooriha, M., Ahmadi, R., Ahadi, H., Emami, S. (2022). Application of kojic acid scaffold in the design of non-tyrosinase enzyme inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design*, 100(2), 290-303. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14065>
- Baki Kekilli, E., Orhan, I. E., Deniz, F. S. S., Eren, G., Emerce, E., Kahraman, A., Aysal, I. A. (2021). *Erodium birandianum* Ilarslan & Yurdak. shows anti-gout effect through xanthine oxidase inhibition: Combination of *in vitro* and *in silico* techniques and profiling of main components by LC-Q-ToF-MS. *Phytochemistry Letters*, 43, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.03.010>
- Bang, S., Han, S., Kim, D. (2008). Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 7(3), 189-193. <https://doi.org/10.1111/j.1473-2165.2008.00387.x>
- Baroni, A. (2018). Long-wave plasma radiofrequency ablation for treatment of xanthelasma palpebrarum. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(1), 121-123. <https://doi.org/10.1111/jocd.12509>
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30(3), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Baumann, L. (2007). Less-known botanical cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy*, 20(5), 330-342. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2007.00147.x>
- Baumann, L. (2007). Skin ageing and its treatment. *The Journal of Pathology*, 211(2), 241-251. <https://doi.org/10.1002/path.2098>
- Bekmezci, E., Altuntuğ, K. (2020). Menopoz ile ilişkili semptomlara yönelik kanıta dayalı uygulamaların incelenmesi. *Journal of General Health Sciences (JGEHES), Necmettin Erbakan University*, 2(3), 167-174. <https://doi.org/10.51123/jgehes.2020.7>
- Bektaş, N. Y., Gürer, Ç. (2022). Argan oil and evaluation of its biological activities. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 12(2), 238-246. <https://doi.org/10.31020/mutfd.1027569>
- Bertrand, J. U., Steingrímsson, E., Jouenne, F., Paillerets, B. B., Larue, L. (2020). Melanoma risk and melanocyte biology. *Acta Dermato Venereologica*, 100(11), adv00139. <https://doi.org/10.2340/00015555-3494>
- Bhattacharya, P., Budnick, I., Singh, M., Thiruppathi, M., Alharshawi, K., Elshabrawy, H., Holterman, M. J., Prabhakar, B. S. (2015). Dual role of GM-CSF as a pro-

- inflammatory and a regulatory cytokine: Implications for immune therapy. *J Interferon Cytokine Res*, 35(8), 585-599. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0149>
- Bishnoi, A., Vinay, K., Parsad, D., Kumar, S., Chatterjee, D., Saikia, U. N. (2021). Oral mycophenolate mofetil in the treatment of acquired dermal macular hyperpigmentation: an open-label pilot study. *Australasian Journal of Dermatology*, 62(3), 278-285. <https://doi.org/10.1111/ajd.13567>
- Bonifacio, M. A., Cerqueni, G., Cometa, S., Licini, C., Sabbatini, L., Mattioli-Belmonte, M., Giglio, E. D. (2020). Insights into arbutin effects on bone cells: Towards the development of antioxidant titanium implants. *Antioxidants*, 9(7), 579. <https://doi.org/10.3390/antiox9070579>
- Boonme, P., Junyaprasert, V. B., Suksawad, N., Songkro, S. (2009). Microemulsions and nanoemulsions: Novel vehicles for whitening cosmeceuticals. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5(4), 373-383. <https://doi.org/10.1166/jbn.2009.1046>
- Brtko, J. (2022). Biological functions of kojic acid and its derivatives in medicine, cosmetics, and food industry: Insights into health aspects. *Archiv Der Pharmazie*, 355(10). <https://doi.org/10.1002/ardp.202200215>
- Burger, P., Landreau, A., Azoulay, S., Michel, T., Fernandez, X. (2016). Skin whitening cosmetics: feedback and challenges in the development of natural skin lighteners. *Cosmetics*, 3, 36. <https://doi.org/10.3390/cosmetics3040036>
- Burnett, C. L., Bergfeld, W. F., Belsito, D., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Andersen, F. A. (2010). Final report of the safety assessment of kojic acid as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 29(6), 244S-273S. <https://doi.org/10.1177/1091581810385956>
- Cela-López, J. M., Roldán, C., Gómez-Lizarraga, G., Martínez, V. (2021). A natural alternative treatment for urinary tract infections: Itxasol[®], the importance of the formulation. *Molecules*, 26(15), 4564. <https://doi.org/10.3390/molecules26154564>
- Che Marzuki, N. H., Wahab, R. A., Abdul Hamid, M. (2019). An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 779-797. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1620124>
- Chekol, T. N. (2019). Substrate specificity at the molybdenum site in xanthine oxidase enzyme. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 1-25. <https://doi.org/10.9734/ijbcrr/2019/v26i430102>
- Cheng, S., Liu, R. H., Sheu, J. N., Chen, S. T., Sinchaikul, S., Tsay, G. J. (2006). Toxicogenomics of kojic acid on gene expression profiling of A375 human malignant melanoma cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 655-669. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.655>
- Cheng, S., Liu, R. H., Sheu, J., Chen, S., Sinchaikul, S., Tsay, G. J. (2006). Toxicogenomics of A375 human malignant melanoma cells treated with arbutin. *Journal of Biomedical Science*, 14(1), 87-105. <https://doi.org/10.1007/s11373-006-9130-6>

- Chiu, A., Kimball, A. B. (2003). Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *British Journal of Dermatology*, 149(4), 681-691. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05540.x>
- Chung, J. H., Eun, H. C. (2007). Angiogenesis in skin aging and photoaging. *The Journal of Dermatology*, 34(9), 593-600. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.2007.00341.x>
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A. (2012). Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. *Central European Journal of Biology*, 8, 315-330, 2013. <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0141-1>
- Cichorek, M., Wachulska, M., Stasiewicz, A., Tymińska, A. (2013). Skin melanocytes: Biology and development. *Advances in Dermatology and Allergology*, 1, 30-41. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>
- Claudia C., Juliano, A. (2022). Spreading of dangerous skin-lightening products as a result of colourism: A review. *Applied Sciences*, 12 (6), 3177. <https://doi.org/10.3390/app12063177>
- Cooksey, C. J., Garratt P, J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. (1997). Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 26226–26235. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.42.26226>
- Cos, P., Li, Y., Calomme, M., Hu, J., Cimanga, K., Poel, B. V., Berghe, D. V. (1998). Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 61(1), 71-76. <https://doi.org/10.1021/np970237h>
- Cüre, K. (2016). Facial hyperpigmentations and their management. *The Medical Journal of Okmeydani Training and Research Hospital*. <https://doi.org/10.5222/otd.2016.1069>
- Dauids, L. M., Wyk, J. C. V., Khumalo, N. P., Jablonski, N. G. (2016). Phenomenon of skin lightening: Is it right to be light? *South African Journal of Science*, 112(11/12), 5. <https://doi.org/10.17159/sajs.2016/20160056>
- Davis, C. R., Martínez, C., Howarter, J. A., Erk, K. A. (2021). Predicting spontaneous emulsification in saltwater environments using the HLD model. *Langmuir*, 37(29), 8866-8875. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c01277>
- Dias, R., Oliveira, H., Fernandes, I., Simal-Gandara, J., Perez-Gregorio, R. (2021). Recent advances in extracting phenolic compounds from food and their use in disease prevention and as cosmetics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(7), 1130–1151. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1754162>
- Draelos, Z. D. (2011). The art and science of new advances in cosmeceuticals. *Clinical Plastic Surgery*, 38, 397-407. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2011.02.002>
- El-Metwally, M. M., ElBealy, E. R., Beltagy, D. M., Shaaban, M., El-kott, A. F. (2020). Suppressive efficiency of kojic acid from *Aspergillus tamarii* MM11 against HEPG-2

- cell line derived from human liver cancer. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19(8), 1661-1668. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v19i8.14>
- Erarslan, Z. B., Genç, G. E. (2018). Plants in hair cosmetics. *Türkiye Klinikleri Journal of Dermatology*, 28(3), 93-106. <https://doi.org/10.5336/dermato.2018-63672>
- Erdogan Orhan, I., Senol, F. S., Aslan Erdem, S., Tatli, I. I., Kartal, M., Alp, S. (2015). Tyrosinase and cholinesterase inhibitory potential and flavonoid characterization of *Viola odorata* L. (sweet violet). *Phytotherapy Research*, 29(9), 1304-1310. <https://doi.org/10.1002/ptr.5378>
- Ezure, T., Amano, S., Matsuzaki, K. (2022). Infiltration of subcutaneous adipose layer into the dermal layer with aging. *Skin Research and Technology*, 28(2), 311-316. <https://doi.org/10.1111/srt.13133>
- Farage, Miranda A., Miller, Kenneth W., Elsner, P., Maibach, H. I. (2007). Structural characteristics of the aging skin: A review. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 26(4), 343-357. <https://doi.org/10.0.1080/15569520701622951>
- Feóli, A. M. P., Macagnan, F. E., Piovesan, C. H., Bodanese, L. C., Siqueira, I. R. (2014). Xanthine oxidase activity is associated with risk factors for cardiovascular disease and inflammatory and oxidative status markers in metabolic syndrome: effects of a single exercise session. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/587083>
- Fernández-Flores, Á., Barja, J., Vilas-Sueiro, A., Alija, A. (2018). Histopathological findings in pregnancy associated cutaneous hyperpigmentation. *Journal of Cutaneous Pathology*, 45(4), 286-289. <https://doi.org/10.1111/cup.13108>
- Findlay, G. H. (1982). Ochronosis following skin bleaching with hydroquinone. *Journal of American Academy of Dermatology*, 6, 1092-1093. [https://doi.org/10.1016/s0190-9622\(82\)80104-7](https://doi.org/10.1016/s0190-9622(82)80104-7)
- Flurkey, A., Cooksey, J., Reddy, A. R., Spoonmore, K., Rescigno, A., Inlow, J. K., Flurkey, W. H. (2008). Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4760-4768. <https://doi.org/10.1021/jf800109a>
- Gamage, D. G. N. D., Dharmadasa, R., Abeysinghe, D. C., Wijesekara, R., Prathapasinghe, G. A., Someya, T. (2022). Global perspective of plant-based cosmetic industry and possible contribution of Sri Lanka to the development of herbal cosmetics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-26. <https://doi.org/10.1155/2022/9940548>
- Georgiev, V., Slavov, A., Vasileva, I., Pavlov, A. (2018). Plant cell culture as emerging technology for production of active cosmetic ingredients. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 779-798. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800066>
- Gilchrest, B. A., Park, H., Eller, M. S., Yaar, M. (1996). Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochemistry and Photobiology*, 63(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb02988.x>

- Gokce, B. (2023). Yeni nesil kozmetik peptid argireline (asetil heksapeptid-8) molekülünün *in vitro* anti-tirozinaz, anti-kollajenaz, anti-elastaz ve anti hyaluronidaz etkilerinin araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 14(2), 227–234. <https://doi.org/10.22312/sdusbed.1330756>
- Han, A. R., Nam, M. H., Lee, K. W. (2016). Plantamajoside inhibits UVB and advanced glycation end products-induced MMP-1 expression by suppressing the MAPK and NF- κ B pathways in HACAT cells. *Photochemistry and Photobiology*, 92(5), 708-719. <https://doi.org/10.1111/php.12615>
- Hendriani, R., Nursamsiar, N., Tjitraesmi, A. (2017). *In vitro* and *in silico* evaluation of xanthine oxidase inhibitory activity of quercetin contained in *Sonchus arvensis* leaf extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(14), 50. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10s2.19486>
- Hori, I., Nihei, K., Kubo, I. (2004). Structural criteria for depigmenting mechanism of arbutin. *Phytotherapy Research*, 18(6), 475-479. <https://doi.org/10.1002/ptr.1456>
- Hsiao, N., Tseng, T., Lee, Y., Chen, W., Lin, H., Chen, Y., Tsai, K. (2014). Serendipitous discovery of short peptides from natural products as tyrosinase inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(11), 3099-3111. <https://doi.org/10.1021/ci500370x>
- Jakimiuk, K., Gesek, J., Atanasov, A. G. (2021). Flavonoids as inhibitors of human neutrophil elastase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 1016-1028. <https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1927006>
- Jeyabalan, S., Subramanian, K., Cheekala, U. M. R., Krishnan, C. (2017). Hypouricemic activity of *Morinda citrifolia* (noni) by inhibition of xanthine oxidase for treatment of gout. *International Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy*, 8(2), 213-219. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.082115>
- Kanlayavattanakul, M., Lourith, N. (2017). Skin hyperpigmentation treatment using herbs: A review of clinical evidences. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*, 20(2), 123-131. <https://doi.org/10.1080/14764172.2017.1368666>
- Kaul, S., Gulati, N., Verma, D., Mukherjee, S., Nagaich, U. (2018). Role of nanotechnology in cosmeceuticals: A review of recent advances. *Journal of Pharmaceutics*, 2018, 1-19. <https://doi.org/10.1155/2018/3420204>.
- Kim, C. S., Noh, S. G., Park, Y., Kang, D., Chun, P., Chung, H. Y., Moon, H. R. (2018). A potent tyrosinase inhibitor, (*E*)-3-(2,4-dihydroxyphenyl)-1-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one, with anti-melanogenesis properties in α -MSH and IBMX-induced B16F10 melanoma cells. *Molecules*, 23(10), 2725. <https://doi.org/10.3390/molecules23102725>
- Kim, J. Y., Shin, J. Y., Kim, M. R., Hann, S. K. (2012). Sirna-mediated knock-down of COX-2 in melanocytes suppresses melanogenesis. *Experimental Dermatology*, 21(6), 420-425. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2012.01483.x>

- Kim, Y. J. (2013). Rhamnetin attenuates melanogenesis by suppressing oxidative stress and pro-inflammatory mediators. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(8), 1341-1347. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00276>
- Kim, Y., Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707-1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>
- Kırcı, D., Özşen Batur, Ö., Demirci, B. (2023). Kojik asit ile *Lavandula angustifolia* L. uçucu yağının antimikrobiyal kombinasyonu. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 48(1). <https://doi.org/10.33483/jfpau.1399176>
- Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M., Szeimies, R. (2011). Skin ageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(8), 873-884. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03963.x>
- Kong, L., Zhang, Y., Pan, X., Tan, R., Chen, C. (2000). Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57(3), 500-505. <https://doi.org/10.1007/pl00000710>
- Koşar, Ş., Ekinci, M., Öztürk, A. A. (2022). The role of pharmacist in consulting dermacosmetic products according to skin types and needs and nanocosmetics: Traditional review. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 11(2), 119-135. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2022-88399>
- Krishnamoorthy, K., Landge, A. V. (2018). Statistical optimisation of fermentation media for novel *Clostridium novyi*-nt using response surface methodology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2018180026>
- Kubo, I., Kinst-Hori, I. (1999). 2-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyde: A potent tyrosinase inhibitor from African medicinal plants. *Planta Medica*, 65(1), 019-022. <https://doi.org/10.1055/s-1999-13955>
- Kwon, K. J., Bae, S., Kim, K., An, I. S., Ahn, K. J., An, S., Jun, H. (2014). Asiaticoside, a component of *Centella asiatica*, inhibits melanogenesis in B16F10 mouse melanoma. *Molecular Medicine Reports*, 10(1), 503-507. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2159>
- Lanuti, E., Kirsner, R. S. (2010). Effects of pollution on skin aging. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(12), 2696. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.323>
- Lee, H. R., Yang, J. H., Lee, J. H., Kim, K. M., Cho, S. S., Baek, J. S., Ki, S. H. (2023). Protective effect of *Castanopsis sieboldii* extract against UVB-induced photodamage. *Molecules*, 28(6), 2842. <https://doi.org/10.3390/molecules28062842>
- Lee, J. H., Fisher, D. E. (2014). Melanocyte stem cells as potential therapeutics in skin disorders. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 14(11), 1569-1579. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.935331>

- Lee, S. Y., Baek, N., Nam, T. (2016). Natural, semisynthetic and synthetic tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(1), 1–13. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1004058>
- Lee, S., Sancheti, S., Seo, S. (2009). Potent antielastase and antityrosinase activities of *Astilbe chinensis*. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(4), 127-129. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2009.127.129>
- Lf, T., Rajagopal, M., Chinnappan, S., Venkatalakshmi, R., VI, Y. (2021). Various plants and bioactive constituents for pigmentation control: A review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 6106-6112. <https://doi.org/10.52711/0974-360x.2021.01061>.
- Li, Y., Zhen, X., Yao, X., Lu, J. (2023). Successful treatment of minocycline-induced facial hyperpigmentation with a combination of chemical peels and intense pulsed light. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 16, 253-256. <https://doi.org/10.2147/ccid.s394754>
- Lim, Y., Lee, E. H., Kang, T. H., Ha, S. K., Oh, M. S., Kim, S. W., Kim, S. Y. (2009). Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of α -melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Archives of Pharmacal Research*, 32(3), 367-373. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-1309-8>
- Lin, R. D., Chen, M. C., Liu, Y. L., Lin, Y., Lu, M., Hsu, F., Lee, M. H. (2015). New whitening constituents from Taiwan-native *Pyracantha koidzumii*: Structures and tyrosinase inhibitory analysis in human epidermal melanocytes. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28598-28613. <https://doi.org/10.3390/ijms161226115>
- Liu, L., Pu, X., Zhou, Y., Wu, X., Luo, D., Ren, Z. (2020). Phase inversion of pickering emulsions by electrolyte for potential reversible water-in-oil drilling fluids. *Energy & Fuels*, 34(2), 1317-1328. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b03117>
- Liu, Y., Shao, W., Fang, Q., Zhao, W., Wang, S., Wu, L., Tan, W. (2022). A combination treatment of drug-laser-photon for melasma: a retrospective study of clinical cases. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 22(3), 822-830. <https://doi.org/10.1111/jocd.15488>
- Ma, J., Chen, S., Li, Y., Wu, X., Song, Z. (2022). Arbutin improves gut development and serum lipids via *Lactobacillus intestinalis*. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.948573>
- Ma, X., Qiao, Z., Huang, Z., Jing, X., Li, Z., Tang, H. (2014). Influence of temperature on the phase inversion of chlorinated polypropylene. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(11). <https://doi.org/10.1002/app.40325>.
- Maali, A., Hamed Mosavian, M. T. (2013). Preparation and application of nanoemulsions in the last decade (2000–2010). *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34(1), 92-105. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.648498>
- Maamoun, H. S., Rabie, G. H., Shaker, I., Alaidaroos, B. A., El-Sayed, A. S. A. (2021). Biochemical properties of tyrosinase from *Aspergillus terreus* and *Penicillium*

- copticola*; undecanoic acid from *Aspergillus flavus*, an endophyte of *Moringa oleifera*, is a novel potent tyrosinase inhibitor. *Molecules*, 26(5), 1309. <https://doi.org/10.3390/molecules26051309>
- MacNeil, S. (2008). Biomaterials for tissue engineering of skin. *Materials Today*, 11(5), 26-35. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70087-7](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70087-7)
- Mahé, A., Ly, F., Aymard, G., Dangou, J. M. (2003). Skin diseases associated with the cosmetic use of bleaching products in women from Dakar, Senegal. *British Journal of Dermatology*, 148(3), 493-500. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05161.x>
- Maillard, M., Cuvelier, M., Berset, C. (2003). Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(10). <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0812-z>
- Malarz, J., Yudina, Y. V., Stojakowska, A. (2023). Hairy root cultures as a source of phenolic antioxidants: simple phenolics, phenolic acids, phenylethanoids, and hydroxycinnamates. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 6920. <https://doi.org/10.3390/ijms24086920>
- Malikhah, H., Herdyastuti, N. (2023). Effect of kaffir lime (*Cytrus hystrix*) leaf extract on xanthine oxidase inhibition. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 17(1), 1069-1078. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2023.17.1.0100>
- Marijan, M., Tomić, D., Strawa, J. W., Jakupović, L., Inić, S., Jug, M., Končić, M. Z. (2023). Optimization of cyclodextrin-assisted extraction of phenolics from *Helichrysum italicum* for preparation of extracts with anti-elastase and anti-collagenase properties. *Metabolites*, 13(2), 257. <https://doi.org/10.3390/metabo13020257>
- Masum, M. N., Yamauchi, K., Mitsunaga, T. (2019). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources as skin-lightening agents. *Reviews in Agricultural Science*, 7, 41-58. <https://doi.org/10.7831/ras.7.41>
- Masuoka, N., Nihei, K., Kubo, I. (2006). Xanthine oxidase inhibitory activity of alkyl gallates. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50(8), 725-731. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500250>
- Mizoguchi, M. (2004). Melanocyte development: with a message of encouragement to young women scientists. *Pigment Cell Research*, 17(5), 533-544. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00163.x>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- Muchtaridi, M., Dewi, M. L. (2020). The recent update of deoxyarbutin: a skin depigmentation agent with tyrosinase inhibition targeting. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 1-7. <https://doi.org/10.22159/ijap.2020v12i3.36957>

- Nascimento, L. B. d. S., Gori, A., Raffaelli, A., Ferrini, F., Brunetti, C. (2021). Phenolic compounds from leaves and flowers of *Hibiscus roseus*: potential skin cosmetic applications of an under-investigated species. *Plants*, 10(3), 522. <https://doi.org/10.3390/plants10030522>
- Nascimento, L. D. d., Moraes, Â. A. B. d., Costa, K. S. d., Galúcio, J. M. P., Taube, P. S., Costa, C. M. L., Faria, L. J. G. d. (2020). Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: New findings and potential applications. *Biomolecules*, 10(7), 988. <https://doi.org/10.3390/biom10070988>
- Nautiyal, A., Wairkar, S. (2021). Management of hyperpigmentation: current treatments and emerging therapies. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 34(6), 1000-1014. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12986>
- Naz, S., Holloway, P., Ata, A., Sener, B. (2022). Exploring medicinal plants for the development of natural enzyme inhibitors. P. K. Mukherjee (Ed.), *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. Elsevier, s. 671-690. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85542-6.00005-6>
- Nenadis, N., Tsimidou, M. (2002). Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH') tests. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79, 1191-1195.
- Ng, Z. X., Samsuri, S. N., Yong, P. H. (2020). The antioxidant index and chemometric analysis of tannin, flavonoid, and total phenolic extracted from medicinal plant foods with the solvents of different polarities. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14680>
- Nizioł-Łukaszewska, Z., Zagórska-Dziok, M., Ziemlewska, A., Bujak, T. (2020). Comparison of the antiaging and protective properties of plants from the Apiaceae family. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2020/5307614>
- No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J. (1999). Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Science*, 65, PL241-246. [https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(99\)00492-0](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(99)00492-0)
- Nosheen, S., Kaleem, M. (2023). Recovery optimization of plant waste derived antioxidants and their incorporation in cosmetic creams to enhance antioxidant potential: A cost-effective approach. Preprint, 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2876735/v1>
- Nunes, J. A., Araújo, R. S. A., Silva, F. N., Cytarska, J., Łączkowski, K. Z., Cardoso, S. H., Silva-Júnior, E. F. (2023). Coumarin-based compounds as inhibitors of tyrosinase/tyrosine hydroxylase: Synthesis, kinetic studies, and *in silico* approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5216. <https://doi.org/10.3390/ijms24065216>
- Okombi, S., Rival, D., Bonnet, S., Mariotte, A., Perrier, É., Boumendjel, A. (2005). Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(1), 329-333. <https://doi.org/10.1021/jm050715i>

- Önel, G. T., Akbay, H. G. Y. (2022). Essential and fixed oils: Evaluation of chemical structure-activity relationship. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1), 104-114. <https://doi.org/10.55117/bufbd.1021436>
- Pacheco-Palencia, L. A., Noratto, G., Hingorani, L., Talcott, S. T., Mertens-Talcott, S. U. (2008). Protective effects of standardized pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenolic extract in ultraviolet-irradiated human skin fibroblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(18), 8434-8441. <https://doi.org/10.1021/jf8005307>
- Pandey, V., Shukla, R., Garg, A., Kori, M. L., Rai, G. (2020). Nanoemulsion in cosmetic: from laboratory to market. A. Nanda, S. Nanda, T. A. Nguyen, S. Rajendran, Y. Slimani, *Nanocosmetics Fundamentals, Applications and Toxicity* (pp. 327-347). Elsevier, s. 327-347.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H-S., Bae, H. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: Mechanism and applications in skin health, cosmetic and agriculture industries. *Phytotherapy Research*, 21, 805-816. <https://doi.org/10.1002/ptr.2184>
- Passeron, T., Genedy, R. M., Salah, L. A., Fusade, T., Kosiratna, G., Laubach, H., Badawi, A. (2019). Laser treatment of hyperpigmented lesions: Position statement of the European society of laser in dermatology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 33(6), 987-1005. <https://doi.org/10.1111/jdv.15497>
- Pauff, J. M., Zhang, J., Bell, C. E., Hille, R. (2008). Substrate orientation in xanthine oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8), 4818-4824. <https://doi.org/10.1074/jbc.m707918200>
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V. (2017). Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 403-425. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1256889>
- Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelyi, D., Dittel, B. N. (2007). GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 178(1), 39-48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.39>
- Proksch, E., Brandner, J. M., Jensen, J. M. (2008). The skin: An indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17(12), 1063-1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>
- Randon, M. I., Gaviria, J. I. (2005). Review of skin-lightening agents. *Dermatologic Surgery*, 31(7), 886-889. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2005.31736>
- Randon, M. I., Gaviria, J. I. (2016). Medical and surgical approaches to skin lightening. Ed. Z. D. Draelos, A. L. Thaman (Editörler), *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. New York: Taylor and Francis. <https://doi.org/10.3109/9781420020854>
- Rattanawiwatpong, P., Wanitphakdeedecha, R., Bumrungpert, A., Maiprasert, M. (2020). Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: A split-face, randomized controlled trial.

- Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(3), 671-676.
<https://doi.org/10.1111/jocd.13305>.
- Ricketts, P., Knight, C. E., Gordon, A. R., Boischio, A., Voutchkov, M. (2020). Mercury exposure associated with use of skin lightening products in Jamaica. *Journal of Health and Pollution*, 10(26). <https://doi.org/10.5696/2156-9614-10.26.200601>.
- Rocha-Filho, P. A., Ferrari, M., Maruno, M., Souza, O. B., Gumiero, V. C. (2017). *In vitro* and *in vivo* evaluation of nanoemulsion containing vegetable extracts. *Cosmetics*, 4(3), 32. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4030032>.
- Romes, N. B., Wahab, R. A., Hamid, M. A. (2021). The role of bioactive phytoconstituents-loaded nanoemulsions for skin improvement: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 711-730. <https://doi.org/10.1080/13102818.2021.1915869>.
- Roselan, M. A., Ashari, S. E., Faujan, N. H., Mohd Faudzi, S. M., Mohamad, R. (2020). An improved nanoemulsion formulation containing kojic monooleate: Optimization, characterization and *in vitro* studies. *Molecules*, 25(11), 2616. <https://doi.org/10.3390/molecules25112616>
- Sarkar, R., Arora, P., Garg, K. V. (2013). Cosmeceuticals for hyperpigmentation: What is available? *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 6(1), 4-11. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.110089>
- Schmidt, S., Nguyen, A. T., Vu, H. Q., Tran, N. N., Sareela, M., Fisk, I. D., Hessel, V. (2023). Microfluidic spontaneous emulsification for generation of o/w nanoemulsions-opportunity for in-space manufacturing. *Advanced Healthcare Materials*, 12(23). <https://doi.org/10.1002/adhm.202203363>
- Senol, F.S., (2016). *Bitkisel Kaynaklı Kozmetik Ürün Geliştirilmesi Üzerine Farmakognozik Araştırmalar*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 63-68.
- Sharma, N. K., Thakur, S., Thakur, N., Savitri, Bhalla, T. C. (2015). Thermostable xanthine oxidase activity from *Bacillus pumilus* RL-2d isolated from Manikaran thermal spring: production and characterization. *Indian Journal of Microbiology*, 56(1), 88-98. <https://doi.org/10.1007/s12088-015-0547-3>
- Shim, E., Song, E., Choi, K., Choi, H. J., Hwang, J. R. (2017). Inhibitory effect of *Gastrodia elata* Blume extract on alpha-melanocyte stimulating hormone-induced melanogenesis in murine B16F10 melanoma. *Nutrition Research and Practice*, 11(3), 173. <https://doi.org/10.4162/nrp.2017.11.3.173>
- Shin, S., Cho, S. H., Park, D., Jung, E. (2019). Anti-skin aging properties of protocatechuic acid *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(4), 977-984. <https://doi.org/10.1111/jocd.13086>
- Silva, C. C., Benati, R. B., Massaro, T. N. C., Pereira, K. C., Gaspar, L. R., Marcato, P. D. (2023). Antioxidant and anti-tyrosinase activities of quercetin-loaded olive oil nanoemulsion as potential formulation for skin hyperpigmentation. *Journal of*

- Dispersion Science and Technology*, 44(14), 2628–2638. <https://doi.org/10.1080/01932691.2022.2116715>.
- Singh, B. K., Park, S. H., Lee, H., Goo, Y. A., Kim, H. S., Cho, S. H., Kim, E. K. (2016). Kojic acid peptide: A new compound with anti-tyrosinase potential. *Annals of Dermatology*, 28(5), 555. <https://doi.org/10.5021/ad.2016.28.5.555>
- Slováková, M., Köhlerova, R., Dvořáková, P., Vanova, V., Špačková, M., Munzarová, M. (2022). Clostridial collagenase immobilized on chitosan nanofibers for burn healing. *Military Medical Science Letters*, 91(4), 324-334. <https://doi.org/10.31482/mmsl.2022.012>
- Sommerlad, M. (2021). Skin lightening: Causes and complications. *Clinical and Experimental Dermatology*, 47(2), 264-270. <https://doi.org/10.1111/ced.14972>.
- Stanković, M., Savic, V., Živković, J., Stanojević, L. P., Tadić, V., Arsić, I. (2019). Tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of wild *Rosa canina* L. and *Sorbus aucuparia* L. fruit extracts. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 76(3), 523-533. <https://doi.org/10.32383/appdr/103431>
- Sturm, R. A., Box, N. F., Ramsay, M. (1998). Human pigmentation genetics: The difference is only skin deep. *Bioessays*, 20(9), 712-721. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199809\)20:9<712:AID-BIES4>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199809)20:9<712:AID-BIES4>3.0.CO;2-I)
- Suwarjo, I. D., Azzahra, A. F., Suryadi, H. (2018). Isolation of kojic acid producing mold using complex carbon sources. *Pharmacognosy Journal*, 10(6), 1089-1092. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.6.184>
- Syed Azhar, S. N. A., Ashari, S. E., Salim, N. (2018). Development of a kojic monooleate-enriched oil-in-water nanoemulsion as a potential carrier for hyperpigmentation treatment. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 6465-6479. <https://doi.org/10.2147/IJN.S171532>
- Tahir, K. A., Miskad, U. A., Djawad, K., Sartini, S., Djide, N., Indrisari, M., Lalo, A. (2021). Tyrosinase enzymes activities and sun protection factor of ethanol extract, water fraction, and *n*-butanol fraction of *Chromolaena odorata* L. leaves. *Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9(A), 493-498. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.6226>
- Tai, A., Ohno, A., Ito, H. (2016). Isolation and characterization of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical cation-scavenging reaction products of arbutin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7285-7290. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02847>
- Tam, H. K., Kelly, A. S., Metzger, A. M., Steinberger, J., Johnson, L. M. (2014). Xanthine oxidase and cardiovascular risk in obese children. *Childhood Obesity*, 10(2), 175-180. <https://doi.org/10.1089/chi.2013.0098>
- Tangau, M. J., Chong, Y. K., Yoon, Y. K. (2022). Advances in cosmeceutical nanotechnology for hyperpigmentation treatment. *Journal of Nanoparticle Research*, 24(8). <https://doi.org/10.1007/s11051-022-05534-z>

- Tezel, H., Balcı, A., Erkekoğlu, P. (2022). Melazma tedavisinde güncel yaklaşımlar ve olası toksik etkileri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, <https://doi.org/10.52794/hujpharm.1005810>
- Tsakovska, I., Pajeva, I., Sharif, M. A., Alov, P., Fioravanzo, E., Kovarich, S., Cronin, M. T. (2017). Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology*, 387, 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.06.008>
- Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P., Hearing, V. J. (1992). A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed dopachrome tautomerase. *The EMBO Journal*, 11(2), 519-526. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05082.x>
- Ubeid, A. A., Zhao, L., Wang, Y., Hantash, B. M. (2009). Short-sequence oligopeptides with inhibitory activity against mushroom and human tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(9), 2242-2249. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.124>
- Uysal, A., Zengin, G., Durak, Y., Aktümsek, A. (2016). *Centaurea pterocaula* özütlerinin antioksidan ve antimitojenik özellikleri ile enzim inhibitör potansiyellerinin incelenmesi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 20(3), 232. <https://doi.org/10.12991/mpj.20162094922>
- Vachiramoni, V., Namasondhi, A., Anunrangsee, T., Jurairattanaporn, N. (2021). A single-blinded, randomized, controlled trial comparing efficacy between low-fluence alexandrite 755-nm picosecond laser and low-fluence neodymium-doped yttrium aluminum garnet (nd:yag) 1064-nm picosecond laser for the treatment of ultraviolet B-induced hyperpigmentation. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 21(3), 1036-1044. <https://doi.org/10.1111/jocd.14591>
- Vasconcelos, A., Pêgo, A. P., Henriques, L., Lamghari, M., Cavaco-Paulo, A. (2010). Protein matrices for improved wound healing: elastase inhibition by a synthetic peptide model. *Biomacromolecules*, 11(9), 2213-2220. <https://doi.org/10.1021/bm100537b>
- Viet, T. D., Xuan, T. D., Anh, L. H. (2021). α -Amyrin and β -amyrin isolated from *Celastrus hindsii* leaves and their antioxidant, anti-xanthine oxidase, and anti-tyrosinase potentials. *Molecules*, 26(23), 7248. <https://doi.org/10.3390/molecules26237248>
- Vinña, J., Gómez-Cabrera, M. C., Lloret, A., Márquez, R., Miñana, J. B., Pallardó, F. V., Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 50(4-5), 271-277. <https://doi.org/10.1080/713803729>
- Wang, R. and Mu, J. (2021). Arbutin attenuates ethanol-induced acute hepatic injury by the modulation of oxidative stress and NRF-2/ho-1 signaling pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(10). <https://doi.org/10.1002/jbt.22872>
- Wester, R. C., Melendres, J., Hui, X. (1998). Human *in vivo* and *in vitro* hydroquinone topical bioavailability, metabolism, and disposition. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 54, 301-317. <https://doi.org/10.1080/009841098158863>

- White, C. R., Darley-Usmar, V., Berrington, W. R., McAdams, M., Gore, J., Thompson, J. A., Freeman, B. A. (1996). Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8745-8749. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8745>
- Wu, T., Firoozabadi, A. (2021). Surfactant-enhanced spontaneous emulsification near the crude oil–water interface. *Langmuir*, 37(15), 4736-4743. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00725>
- Xie, L. P., Chen, Q. X., Huang, H. (2003). Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry*, 68, 487-491. <https://doi.org/10.1023/a:1023620501702>
- Yang, S., Liu, L., Han, J., Tang, Y. (2020). Encapsulating plant ingredients for dermocosmetic application: an updated review of delivery systems and characterization techniques. *International Journal of Cosmetic Science*, 42(1), 16-28. <https://doi.org/10.1111/ics.12592>
- Yano, Y., Kato, E., Ohe, Y., Blandford, D. (2018). Examining the opinions of potential consumers about plant-derived cosmetics: An approach combining word association, co-occurrence network, and multivariate probit analysis. *Journal of Sensory Studies*, 34(2), e12484. <https://doi.org/10.1111/joss.12484>
- Yin, H. A., Wahab, R. A., Rehman, G. U. vd. (2024). A novel water-in-oil-in-water double nanoemulsion of α -mangostin and kojic acid for topical applications. *Arabian Journal of Science and Engineering*, <https://doi.org/10.1007/s13369-023-08659-y>.
- Yırtıcı, Ü. (2019). *Centaurea fenlizii* Reichardt özütünün antioksidan özellikleri ve enzim inhibisyon etkisinin belirlenmesi. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 66-73. <https://doi.org/10.17798/bitlisfen.484336>
- Yoshihisa, Y., Rehman, M. U., Shimizu, T. (2014). Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 23(3), 178-183. <https://doi.org/10.1111/exd.12347>
- Yuan, Y., Jin, W., Nazir, Y., Fercher, C., Blaskovich, M. A. T., Cooper, M. A., Ziora, Z. M. (2020). Tyrosinase inhibitors as potential antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 187, 111892. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111892>
- Zaidi, K. U., Ali, A., Ali, S. A., Naaz, I. (2014). Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry Research International*, 2014, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2014/854687>
- Zehng, Z. P., Tan, H. Y., Chen, J., Wang, M. (2013). Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure-activity relationship study. *Fitoterapia*, 84, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.12.006>
- Zengin, G., Ak, G., Aktümsek, A. (2021). A study on antioxidant and enzyme inhibitory properties of extracts from different parts of *Asphodeline baytopae* (Xanthorrhoeaceae). *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 10(2), 174-181. <https://doi.org/10.46810/tdfd.882790>

- Zhang, S., Duan, E. (2018). Fighting against skin aging: The way from bench to bedside. *Cell Transplant*, 27(5), 729-738. <https://doi.org/10.1177/0963689717725755>
- Zheng, Y., Davis, C. R., Howarter, J. A., Erk, K. A., Martínez, C. (2022). Spontaneous emulsions: Adjusting spontaneity and phase behavior by hydrophilic–lipophilic difference-guided surfactant, salt, and oil selection. *Langmuir*, 38(14), 4276-4286. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c03444>
- Zhou, H., Zhao, J., Li, A., Reetz, M. T. (2019). Chemical and biocatalytic routes to arbutin. *Molecules*, 24(18), 3303. <https://doi.org/10.3390/molecules24183303>
- Zhu, W., Gao, J. (2008). The use of botanical extracts as topical skin-lightening agents for the improvement of skin pigmentation disorders. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 13(1), 20-24. <https://doi.org/10.1038/jidsymp.2008.8>
- Zhu, Y., Chen, C., Zhao, S. J., Yang, J. T., Song, H., Ge, F., Liu, D. (2014). Inhibitory mechanism of salidroside on tyrosinase. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(10), 698-703. <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-10-8>
- Zilles, J. C., Santos, F. L. d., Kulkamp-Guerreiro, I. C., Contri, R. V. (2022). Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives: A review. *Experimental Dermatology*, 31(10), 1500-1521. <https://doi.org/10.1111/exd.14662>
- Zota, A. R., Shamasunder, B. (2017). The environmental injustice of beauty: Framing chemical exposures from beauty products as a health disparities concern. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 217(4), 418.e1-418.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.07.020>
- Zurina, I. M., Gorkun, A. A., Dzhussoeva, E. V., Kolokoltsova, T. D., Markov, D. D., Kosheleva, N. V., Morozov, S. G., Saburina, I. N. (2020). Human melanocyte-derived spheroids: A precise test system for drug screening and a multicellular unit for tissue engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 540. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00540>.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KARAKÜÇÜK Meltem
Uyruğu : T.C.

| Eğitim Derecesi | Okul/Program | Mezuniyet yılı |
|-----------------|---------------------------------------|----------------|
| Doktora | Gazi Üniversitesi | Devam ediyor |
| Lisans | Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi | 2017 |
| Lise | Sami Yangın Anadolu Lisesi | 2012 |

| İş Deneyimi, Yıl | Çalıştığı Yer | Görev |
|--------------------|---|--------|
| 2018- Devam ediyor | Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Farmakovijilans ve Kontrole Tabi Maddeler Dairesi Uyuşturucu ve Psikotrop Maddeler Kontrol Birimi | Eczacı |
| 2017- 2018 | Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı, 100/2000 Öncelikli Alanlar YÖK Bursiyeri (Doğal ve Bitkisel Ürünler, Kozmetik Ürünler), Danışman: Prof. Dr. İlkay ERDOĞAN ORHAN | Eczacı |

Yabancı Dil

İngilizce

Fransızca

Yayınlar

1. Hoti, B., Bakar, F., Karaküçük, M., Günbatan, T., Kılıç, C. S., Gürbüz, İ., Duman, H. “*Ferulago sylvatica* (Besser) Reichb. ve *Ferulago humilis* Boiss. Köklerinin SW480 ve PC-3 Kanser Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Aktivitesi”, XXIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı (BİHAT) 2018, 09-12 Nisan 2018, Antalya.
2. Karaküçük, M., Şenol Deniz, F. S., Dönmez, A. A., Erdoğan Orhan, İ. “Neurobiological Effect of Thirty-Five *Crataegus* Taxa (Hawthorn) Growing in Turkey and Iran through Cholinesterase and Tyrosinase Inhibition and Antioxidant Assays”, Proceedings Book of 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition, Healthy Life & Sport, Ankara, 2019.

Hobiler

Yüzme, Doğa yürüyüşü



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..