

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BADEM VE SOYA KÖK HÜCRE EKSTRAKTLARININ SELÜLİT
OLUŞUMUNU BASKILAMASINI MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Begüm ERKÖK SAKARYA

1202060005

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Haziran 2021

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BADEM VE SOYA KÖK HÜCRE EKSTRAKTLARININ SELÜLİT
OLUŞUMUNU BASKILAMASINI MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Begüm ERKÖK SAKARYA

1202060005

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN,

Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN

Haziran 2021

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan ve yönlendiren, hiçbir zaman yardımını ve desteğini esirgemeyen, akademik kişiliği, samimiyeti, iyi niyeti, çalışma prensipleri ve başarılarıyla bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk ve memnuniyet duyacağım saygıdeğer danışmanım Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya , desteklerini esirgemeyen, bilgileriyle beni aydınlatan ve yol gösteren müdürüm Yıldız BODURLAR'a , laboratuvar çalışmalarımın gerçekleşmesi için beni destekleyen ve tez çalışmamı gerçekleştirmem için tüm imkanları sunan ACTV Biyoteknoloji Laboratuvarlarına , kardeşliğin sadece kan bağı ile olmadığını öğreten, dostluklarını sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, her koşulda yanımda olan yüzümü hep güldüren sevgili arkadaşlarım Begüm GÖKÇE ve Kübra ÇAĞLAR ERKAL'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, beni bugünlere getiren, maddi manevi her konuda desteğini asla esirgemeyen, aldığım her kararda arkamda olan, sevgisini ve inancını tm kalbimle hissettiğim, sevgili babam Taşkın ERKÖK'e, sevgili annem Nurcan ERKÖK'e , ve sevgili ablam Bihter ERKÖK CENGİZ'e , desteği, bana olan inancı ile her düştüğümde ayağı kaldırmayı bilen, her anımı paylaştığım, bütün zor zamanlarımda bana güç veren hayat arkadaşım Berkay SAKARYA'ya, son 6 ayımı daha çekilir bir hale getiren sevginin yalnızca insanlara özel bir duygu olmadığını bana öğreten canım Odin'e, beraber büyüdüğüm, hala büyümeye devam ettiğimiz acısı ile tatlısı ile çok güzel zamanlarımızın olduğu ve olmaya devam ettiği canım arkadaşlarım Ceren ULUS ve Berrin OSMANOĞLU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
TABLO LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	VI
SEMBOL LİSTESİ.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 SELÜLİT	3
2.1.1 Selülit ve Evreleri	5
2.1.2 Selülit tedavisinin hedefleri.....	6
2.1.3 Adipogenez	8
2.1.4 Adipogenezde rol alan faktörler	10
2.1.5 Selülitin Histopatolojisi	11
2.2 SELÜLİT OLUŞUMUNUN GENETİĞİ	12
2.3 SELÜLİT OLUŞUMUNUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI VE İLİŞKİLİ MOLEKÜLLER	13
2.3.1 PPAR γ	13
2.3.2 C/EBP	14
2.3.3 BİTKİ EKSTRAKTLARININ SELÜLİT İLE İLİŞKİSİ.....	15
3 MATERYAL VE METOD	17
3.1 3T3-L1 HÜCRELERİNİN DEVAMLILIĞI VE STOKLANMASI.....	17
3.2 BİTKİ KÖK HÜCRE EKSTRAKTLARININ ELDE EDİLMESİ.....	18
3.3 3T3-L1 HÜCRELERİNİN FARKLILAŞTIRILMASI.....	18

3.4	SOYA KÖK HÜCRE EKSTRAKTININ DOZLARININ 3T3-L1 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ CANLILIĞA ETKİSİNİN MTT İLE BELİRLENMESİ.....	19
3.5	3T3-L1 HÜCRELERİNİN OİL RED O BOYASI İLE BOYANMASI	19
3.6	BAĞ DOKUYA ETKİLEYEN EKSTRAKTLARI BULMAK İÇİN Q-RT-PCR ÇALIŞMASI.....	19
3.6.1	Badem hücresi ekstraktının kolajen ve elastin genlerinin ifadesine etkisinin q-RT PCR analizi ile belirlenmesi	19
3.6.2	Hücrelerden RNA izolasyonunun yapılması.....	20
3.6.3	cDNA sentezi	20
3.6.4	Q-RT PCR Analizi.....	21
4	SONUÇLAR.....	25
4.1	SOYA, BADEM KÖK HÜCRE EKSTRAKTLARININ VE ASKORBİK ASİTİN HÜCRELER ÜZERİNDEKİ TOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ.....	25
4.2	3T3-L1 HÜCRELERİNİN FARKLI LAŞTIRILMASI	26
4.3	BADEM KÖK HÜCRE EKSTRAKTININ KOLAJEN VE ELASTİN GENİNE ETKİSİNİN Q-RT PCR İLE BELİRLENMESİ.....	28
5	TARTIŞMA.....	29
6	KAYNAKLAR	34

TABLO LİSTESİ

Tablo 1cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri	21
Tablo 2 COL1A1 ve Eln genlerinin revers ve forward primer dizileri.....	22
Tablo 3. RT-qPCR reaksiyon kokteylinin hazırlanışı.....	22
Tablo 4. SYBR Green yöntemi ile analizinde kullanılan RT-qPCR termal döngüsü.....	23



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Normal ve Selülitli Cilt Görünümü	4
Şekil 2. 2 Kadınlarda ve erkeklerde bağ doku dizilimi [7]	4
Şekil 2. 3 Selülitin Evreleri [56]	6
Şekil 2. 4 Beyaz Yağ Hücresi	9
Şekil 2. 5 Kahverengi Yağ Hücresi	10
Şekil 3. 1 Hücrelerinin Mikroskop Görüntüsü [62]	18
Şekil 4. 1 Badem Kök Hücre Ekstraktının ve Askorbik asit maddesinin CRL2076 hücreleri üzerindeki Sitotoksitesi	25
Şekil 4. 2 Soya Kök Hücre Ekstraktlarının 3T3-L1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesi	26
Şekil 4. 3 3T3-L1 Hücrelerinde Soya Kök Hücre Ekstresinin Yağ Oluşumuna Etkisi	27
Şekil 4. 4 Soya Kök Hücre Ekstraktlarının 3T3-L1 Hücreleri Üzerinde Trigliserid Oluşumuna Etkisi	27
Şekil 4. 5 Badem Kök Hücre Ekstraktının CRL2076 Hücreleri Üzerinde COL1A1 ve Elastin Gen İfadesine Etkisi	28

KISALTMALAR

ESWT:	Ekstrakorporal şok dalga tedavisi
RF:	Radyofrekans:
GAG:	Glikozaminogilikan:
PPAR γ :	Peroksizom Proliferatör Protein ile Aktifleştirilmiş gamma
IBMX:	3-izobütil 1- metilksantin
RT-PCR:	Kantitatif revers transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA:	Komplementer DNA:
C/EBP:	CCAAT / Enhancer -bağlayıcı protein
ACE:	Angiotensin 1- dönüştürücü enzim
HIF1:	Hypoxia inducible factor 1
DMSO:	Dimetilsülfoksit:
DMEM:	Dubecco's Modified Eagle's Medium
FBS:	Fetal sığır serumu

SEMBOL LİSTESİ

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

cm: Santimetre

cm²: Santimetre kare

nm: Nanometre

ÖZET

Selülit kadınlarda % 80-90 oranda görülen bir bozuluktur. Kesin nedeni bilinmemekle birlikte deri altındaki bağ dokusu ve yağ tabakası arasındaki etkileşimin sonucu olduğu bilinmektedir. Selülit tedavisi ile ilgili uygulanan bir çok yöntem olmasına rağmen hala kesin bir çözüme kavuşturulamamıştır. Ayrıca selülit ve selülit tedavisi ile ilgili yayınların azlığı, selülitin daha fazla araştırılması gerektiğini göstermektedir. Selülit tedavisini temel hedefleri mikrosirkülasyonu artırarak kan dolaşımının artması, bağ dokunun güçlendirilmesi ve yağ oluşumunun azalmasına yöneliktir. Soya bitkisi ve bileşenlerinin adipogenezi baskıladığı ve lipolizi arttırdığı bilinirken, badem bitkisinin ve bileşenlerinin bağ doku bileşenlerini güçlendirici etkisi bilinmektedir. Tezin temel amacı soya ve badem bitkilerinden elde edilen kök hücre ekstraktlarının bitkilerin bilinen özelliklerinden yola çıkarak, bu ekstraktların güvenilirliğini ve etki mekanizmasını kanıtlamak ve selülitte karşı alternatif tedavi yöntemi bulmaktır. Adipogenezin baskılanması ile ilgili etkinlik testleri 3T3-L1 fare pre-adiposit hücreleri üzerinde yapılacaktır, bağ dokunun güçlendirilmesi ile ilgili etkinlik testleri CRL2076 insan normal fibroblast hücreleri üzerinde yapılacaktır.

Anahtar Kelimeler: Selülit, badem, soya, selülit tedavisi, 3T3-L1 hücreleri

ABSTRACT

Cellulite is a disorder seen in 80-90% of women. Although the exact cause is unknown, it is known to be the result of the interaction between subcutaneous connective tissue and fat layer. Although there are many methods used for cellulite treatment, there is still not a definite solution. In addition, the scarcity of publications on cellulite and cellulite treatment indicates that cellulite should be investigated more. The main goals of cellulite treatment are to increase blood circulation by increasing microcirculation, strengthen connective tissue and reduce fat formation. While soybean plant and its components are known to suppress adipogenesis and increase lipolysis, the effect of almond plant and its components to strengthen connective tissue components is known. The main purpose of the thesis is to prove the reliability and mechanism of action of stem cell extracts obtained from soy and almond plants, based on the known properties of the plants and to find alternative treatment methods against cellulite. Efficacy tests for suppressing adipogenesis will be performed on 3T3-L1 mouse pre-adipocyte cells, whereas efficacy tests for strengthening connective tissue will be performed on CRL2076 human normal fibroblast cells.

Key Words: Cellulite, Almond, Soybean, Cellulite treatment, 3T3-L1 cells

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Selülit kadınların hemen hemen hepsinde görülen (%80-90) ciltte portakal kabuğu görünümüne sebep olan bir bozukluktur. Fibroz ağ içerisinde fazla yağ birikimi ile oluşan fizyolojik bir durumdur. Selülit sıklıkla pelvis, kalçalar ve abdominal bölgede görülmektedir. Selülitin kesin nedeni bilinmemektedir fakat deri altındaki bağ dokusu ile yağ tabakası arasındaki etkileşimin bir sonucu olduğu bilinmektedir. Selülitin olası nedenleri arasında genetik faktörler, kilo alımı, sağlıksız beslenme, hareketsiz yaşam tarzı ve sigara kullanımı bulunur. Bunların dışında dar kıyafet giymenin ve çok fazla oturmanında kan dolaşımını yavaşlattığından selülit oluşumuna sebep olduğu bilinmektedir. Ayrıca östrojen, insülin, noradrenalin, tiroid hormonları ile prolaktinin selülit oluşum ihtimalini yükseliği düşünülmektedir. Temel olarak östrojen hormonu azaldıkça deri altındaki bağ dokusunda kan akışında da azalma görülür. Bu bölgede mikrosirkülasyonun azalması bölgenin daha az oksijen alabildiği ve daha az beslenebildiği anlamına gelir. Bu da daha düşük kolajen üremine sebep olur. Bölgesel tedaviden lazer tedavilerine kadar çeşitli tedaviler mevcuttur ve hepsi selülit görünümünü azalttıklarını iddia etmektedir; bununla birlikte, bu tedavilerin sonuçları genellikle hastanın öz değerlendirmesine bağlıdır. Selülitin doğası gereği yağ dokusunun cilt dokusuna kayması nedeniyle, tedavilerin etkili olabilmesi için hem deriyi onarması ve güçlendirmesi hem de dermisin altındaki yağ dokusu hareketinin geri döndürmesi gerekmektedir. Selülit için tedavi stratejileri aşağıdaki şekli ile özetlenmiştir.

Selülit artırıcı faktörlerin azaltılması; Selülit iletici faktörler: stres, kilo alımı, yaşam tarzı ve hormonal faktörlerdir.

Fiziksel, mekanik ve termal yöntemler: Selülit tedavisinde kullanılan çeşitli masaj ve vakumlama tekniklerinin temeli, selülitin dolaşım bozukluğundan kaynaklandığı gerekçesine dayanmaktadır. Bu uygulamaların hepsi dolaşım bozukluğunu gidermek için yapılan uygulamalardır.

Liposuction (yağ aldırma): Liposuction, deri altı yağ birikintilerini azaltmak için kullanılan bir işlemdir. Bazıları tarafından vücut şeklinin iyileştirilmesi için mükemmel bir araç olarak bilinmekle iken selülit için önerilen bir tedavi yöntemi değildir.

Mezoterapi: Mezoterapi, tedavi içerikli ilaç ve ürünlerin derialtına enjeksiyonunu içermektedir. Bu tedavinin bir kullanım alanı, yağ erimesini uyarmak ve selülit görünümünü iyileştirmektir.

Ekstrakorporal şok dalga tedavisi (ESWT): Şok dalgaları, kaynaklandığı noktadan tedavi bölgelerine enerji ileten yüksek genlikte dalgalardır. ESWT'nin deri yağ tabakası kalınlığında önemli bir düşüş sağladığı, selülit görünümünü azaltmada derinin sıklığını arttırmada etkili olduğu bilinmektedir.

Lazer tedavisi: Lazer tedavisi yeni kollajen oluşumunu teşvik eden yara iyileştirici bir yanıt üretmek için deri altına termal enerji verilmesi durumudur.

Radyofrekans tedavisi: Selülitin tedavisinde Radyofrekans (RF) teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır. Genellikle RF enerjisi ile derinin ısıtılmasının, deride kollajen yapımıyla ilişkili doku sıkılaşmasına yol açtığı öne sürülmektedir. Deri altı tabakaya iletilen ısıнын yağ hücrelerinin parçalanmasını sağlayan yöntemdir.

İlaç tedavisi: Selülit tedavisinde çok sayıda ilaç kullanılmaktadır. Bunlar metilksantinler, retinoidler, laktik asit ve bitkisel ilaçları içermektedir.

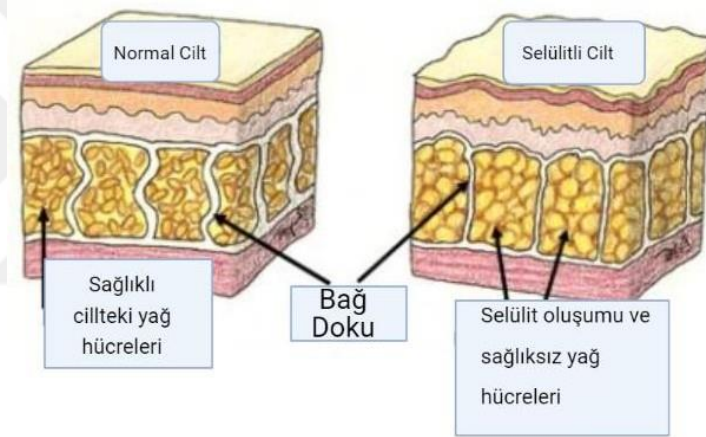
Fakat tüm bunlara rağmen bilimsel olarak etkisi ortaya konulmuş çok az sayıda ürün bulunmaktadır. Selülit ile ilgili az sayıda bilimsel araştırmanın olmasından dolayı, etkisi ve güvenilirliği kanıtlanmış hammadde arayışı devam etmektedir. Soya bitkisinin adipogenezi baskıladığı ve badem bitkisinin ise bağ dokuyu güçlendirdiği bilinmektedir. Selülit tedavisinin temel hedefleri; mikrosirkülasyonu arttırmak, bağ dokuyu güçlendirmek ve adipogenezi baskılamaktır. Biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilmiş farklı etki mekanizmaları ile hammadde geliştiren ACTV Biyoteknoloji'den Soya ve ve Badem hammaddeleri temin edilmiş olup bu hammaddelerin güvenliği ve etkinliğinin in vitro olarak ortaya konulması tezin temel amacıdır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 SELÜLİT

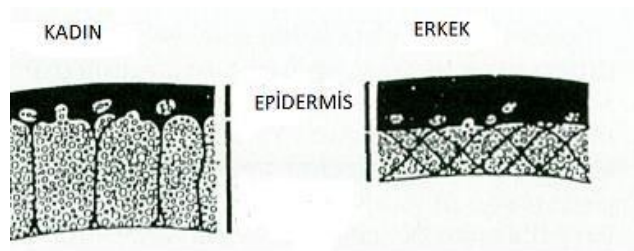
Selülit iyi anlamak için derinin mikroanatomisini bilmek gerekmektedir. Derinin en dıştaki tabakası epidermis olarak adlandırılır, onun hemen altındaki tabakaya ise dermis denmektedir. Dermis saç foliküllerini, ter bezlerini, kan damarlarını, sinir reseptörlerini ve bağ dokuyu barındırmaktadır. Dermisten sonraki tabakaya ise hipodermis (subkutanöz tabaka – ya da yüzeysel fasia) denmektedir [1]. Subkutanöz yağ tabakasının ilk bölümü sellülit tanımlamak için bakılan bölgedir ve bu tabakaya arerolar tabaka (gevşek bağ dokusu) denilmektedir[2], [3]. Bilimsel açıklamalara göre selülit oluşumunun ilk sebebi yağların bulundukları tabakadan (arerolar tabaka-gevşek bağ dokusu) dermise doğru çıkıntı yapması ile tanımlanır. Subkutanöz yağ dokusunda oluşan yapısal değişim ve dermise doğru tabakasının çıkıntılı şekilde büyümesi sonucu deride girintili çıkıntılı bir yapı oluşur [4]. İkinci sebebi ise dermiste bulunan bağ doku bantlarının elastikiyetini kaybetmesi ve dermise doğru çıkıntılı yağ dokusunun büyümesi ile gerçekleşir [5].

Hipodermiste bulunan subkutanöz yağ tabakasında bulunan yağ hücreleri normalden fazla büyüyerek cildin gerilmesine sebep olmaktadır, fakat bağ dokuda bulunan kollajen bantlar belli bir boyuta sahip olduğundan ve elastikiyet özelliğini kaybettiğinden belirli bir boyda kalır ve yağ doku dermise doğru büyüme gösterir bu durumdan ötürü deri (epidermis) girintili çıkıntılı görünmektedir. Bu durum sonucunda dokudaki gerginlik ve sıkışma nedeniyle damarlara baskı olup, lenf ve kan dolaşımında bozulma meydana gelmektedir. Dolaşımda bozukluk meydana geldikten sonra damarlarda basınç oluşmaktadır, basınçtan dolayı ise dokulara damarlardan sıvı geçişi gerçekleşir ve bu durum sonucunda oluşur, böylece hem yağ hücrelerinin genişlemesinden hemde dokuda ödem oluşması nedeniyle dermis ve epidermiste girintili çıkıntılı görüntü meydana gelmektedir [1], [6].



Şekil 2. 1 Normal ve Selülitli Cilt Görünümü

Erkeklerde ve kadınlarda yağ doku arasındaki bağ dokuların dizilimi birbirinden farklılık göstermektedir. Kadınlar bu bağ dokular dermise doğru dikey konumlanırken erkekler ise çaprazlama bir ağ gibi konumlanmaktadır.



Şekil 2. 2 Kadınlarda ve erkeklerde bağ doku dizilimi [7]

Bağ dokularının konumlanmasından dolayı kadınlarda ve erkeklerde yağ depolanması farklı olacağından erkeklerde selülit görülme olasılığı çok daha düşüktür. Ayrıca östrojen yağ yapımını tetiklerken testosteron yağ yıkımını tetiklemektedir. Hormon düzeyleri normal olan kadınlarda östrojen seviyesi erkeklerden yüksekken, hormon seviyesi normal olan erkeklerde ise testosteron seviyesi kadınlardan yüksektir. Bu da erkeklerde selülit görülmesinin bir başka sebebidir. Kadınlarda adipoz dokuda çember benzeri yapı bulunmaktadır ve adipoz doku dermise doğru genişler. Üstelik kadınlarda adipoz dokudaki bağ dokusu dermise dik (vertikal) olacak şekilde konumlanmıştır. Erkeklerde ise bağ dokusu dizilimi çapraz çizgiler şeklindedir ve yağ dokusu büyüdüğünde yan (leteral) ve içlere (internal) olarak büyümektedir. Bu yüzden erkeklerde dermise doğru girintili- çıkıntılı bir büyüme olmaz. Ayrıca erkeklerde kadınlara göre dar ve sıkı epidermis-dermis yapısı bulunmaktadır [8].

2.1.1 Selülit ve Evreleri

Selülit, histopatolojik ve klinik özelliklerine göre dört evrede incelenebilir [9]:

1. EVRE: Dışarıdan bakıldığında gözle görülür bir şekil değişikliği olmaz, sadece histopatolojik bulgular mevcuttur. (areolar tabakada kalınlaşma, damar geçirgenliğinde azalma.)
2. EVRE: Deri sıkıştırıldığında soluk renk gözlemlenmesi, doku ısısında azalma ve elastikiyette azalma meydana gelir. Deri sıkıştırılmadığında yani serbest bırakıldığında değişiklik gözle görülmez [10].
3. EVRE:
Deri sıkıştırılmadığında yani dinlenme anında bile portakal kabuğu görünümünde gözükmemektedir. Elastikiyette azalma, ısıda azalma major değişikliklerdendir. Adipositler bir araya gelerek küçük nodüller oluştururlar [10].
4. EVRE: 3. Evre ile aynı özellikler görünmektedir. Derin dokularda yapışıklık olur ve bu sebepten dolayı tam anlamıyla deride dalgalı bir görünüm hakim olur [10].



Şekil 2. 3 Selülitin Evreleri [56]

2.1.2 Selülit tedavisinin hedefleri

Rossi ve Vergnanini yayınladıkları derlemede selülitin bir çok hedefinin olduğunu belirtmiştir. Onların analizine göre fibroblastlar östrojen ile aktive olurlar ve glikozaminogilikan (GAG) sentezini arttırlar. GAG sentezinin artması çatlak ve ödemi arttırmaktadır. Ödem oluşması sonucunda kan damarlarında basınç olduğu için hipoksiya tetiklenir. Bölgesel inflamatuvar sitokinler kolajen sentezini indüklemektedir. Kapiler basınç artarken plazma osmotik basıncını azaltır ve çatlak oluşması için ozmatik basıncı artırır bu da hücre içi ödeme sebep olur. Osmatik gücün artması fibroblastların hücre fenotipini etkilemektedir. Subkutanöz yağ dokunun anatomisi süperfizyal bantlar ile iki tabakaya ayrılmıştır. Dermise yakın olan tabaka areolar tabaka olarak adlandırılır ve globuler şekilli büyük adipositleri barındırır bu adipositler vertikal olarak düzenli şekilde sıralanırlar. Bu bölgede kan damarları çeşitli ve kırılmandır. Derinde bulunan tabakada ise (yani dermisten uzak olan) hücreler küçük ve horizontal şekilde dizilmişlerdir ve kan damarları geniştir. İnsanlar kilo verdiğinde bu derinde bulunan tabaka genişler. Kadınlarda ve çocuklarda areolar tabaka incedir. Bu tabaka büyük bir çoğunlukla östrojen ile kontrol edilir ve kalça kemiğinde adipositlerin lipolize daha dayanıklı olmasını sağlar. Çeşitli hormonlar lipogenezi stimüle etmektedir. (insülin, östrojen, prolaktin). Fakat ketokalamınler lipolizi adenil siklazın aktivasyonu ile azaltırlar. Selülit tedavisi için uygulama yapılan tüm tedaviler orta düzeyde tedavi ederken uzun vade de bir düzelme sağlamamaktadır, kısacası selülit yine geri dönüşebilmektedir. Selülit tedavisi ile ilgili yapılan çalışmalar az kişi sayısı ile hatalı yöntemler kullanılarak yapıldığında her bir tedavi yönteminin başarısı şüpheli olarak değerlendirilebilir. Selülit tedavisi için yöntemleri sıralamak gerekirse; şiddetlendiren

faktörlerin ortadan kaldırılması, fiziksel-kimyasal ve ısıya dayalı yöntemler, farmakolojik yöntemler olarak sıralanabilir.

2.1.2.1 *Kilo Verme*

Selülit obez insanlarda yani hem obez kadınlarda hem obez erkeklerde görülmektedir. Aynı zamanda normal kiloda olan kadınlarda da selülit görülür. Kilo kaybından sonra selülit şiddetinde azalma görüldüğü bildirilmiştir.[11]

2.1.2.2 *Mezoterapi*

Mezoterapi; yağ dokunun erimesi için deriye bir takım maddelerin enjeksiyonu işlemidir [12]. Genellikle kullanılması tercih edilen maddeler lipoliz sağlayan maddeler olup, fosfodiesteraz enzimini inhibe edici ve c-AMP miktarını arttırıcı olarak görev yaparlar [13].

2.1.2.3 *Topikal Ajanlar*

Topikal ajanlar masajla birlikte kombine şekilde uygulanmaktadır. Selülitin erken evresinde topikal ajan uygulanması selülit tedavisi etmektedir. Ayrıca topikal uygulamanın terapotik etki göstermesi için aktif içeriklerin konsantrasyonlarının etkili düzeyde kullanılması gerekmektedir [5], [14], [15].

Metilksantinler ve retinoidler selülitin topikal formülasyonlarında kullanılmaktadır. Hipoteze göre metilksantinler lipolizi aktive, fosfodiesterazı enzimini ise inhibe etmektedir. Retinoidler ise selülit; dermal kalınlığı, anjiyogenezi, yeni bağ doku bileşenlerinin sentezini ve aktif fibroblast sayısını arttırarak tedavi etmektedir. Her iki ajan için de (retinoidler ve metilksantinler) çeşitli ve tutarlı yayınlar bulunmaktadır. Fakat çalışmalar uzun süreli değil de kısa süreli takip edildiği için etkinliği yeteri kadar bilinmemektedir. Genel olarak değerlendirildiğinde bu formülasyonlar kollajen üretimini arttırıp, cilt gevşekliğini azaltarak tedavi etmektedir.

2.1.2.4 *Selektif kriyoliz*

Kriyoliz bölgesel yağlanmanın giderilmesi ve adipositlerin sıcaklıktan faydalanılarak kırılması esasına dayanan bir yöntemdir. Adiposit hücreleri içerisinde bulunan sitoplazmadaki lipidlerin, donma sıcaklığından daha düşük sıcaklıklar uygulanarak kristalize edilmesi temeline dayanmaktadır [16]. Kriyoliz uygulanan alanlarda görünür

derecede yağ tabakasında azalma görülmüş ve herhangi bir yan etkiye ratlanmamıştır [17].

2.1.2.5 Bitkisel ekstreler, Kimyasal ve Doğal kaynaklı bileşikler

Yeşil çay ve kırmızı üzüm içinde bulunan flavonoidler sayesinde, sandal ağacı içinde bulunan polar ve nonpolar lipitler sayesinde antioksidan etki gösterir ve lenfatik damarlardaki sızdırmazlık bariyerini güçlendirmektedir. Kahve ve kakao bitkisinin en belirgin özellikleri içerisindeki flavonoidler sayesinde lipogeniz baskılamak ve lipolizi arttırmaktır. Dokuda gevşeme olması selülitte sebep olan diğer etkenlerde biridir. Bu sebeple retinoidler, alfa hidroksi asitler, hyaluronik asit, izoflavonoidler dokuyu sıkılaştırarak selülit önlemektedirler [18]. *Centtella asiatica* içerisinde bulunan kafein ile mikrosirkülasyonu arttırmakta madakassik asit, madekossosit ve asiyatikosit nedeniyle kolajen sentezini artırır ve bağ dokunun güçlenmesini sağlamaktadır [19], [20]. Soya, *Ginko biloba*, Hint bademi peroksizom proliferatör aktive reseptör agonisti olarak görev yaparlar [20].

Kısacası selülit tedavisinin hedeflerini özetlemek gerekirse;

- 1- Mikrosirkülasyonun artırılması
- 2- Bağ dokunun güçlenmesi
- 3- Yağ hücresi oluşumunun azalarak adipoz doku hacminin azalması selülitin hedefleridir.

2.1.3 Adipogenez

Adipogenez; pre-adipositlerin yağ hücrelerine dönüşmesi olarak tanımlanabilmektedir. Besin alımının fazla olmasına göre adiposit hücreleri büyüklüklerini arttırabilirler. Yetişkinler yağ hücrelerine dönüşecek yeni pre-adiposit hücreleri üretebilirler. Pre-adipositlerin adipositlere dönüşmesinde PPAR γ ve C/EBP temel rol oynamaktadır.

2.1.3.1 Pre-adiposit adiposit dönüşümü

Preadipositlerin, olgun yağ dolu adipositlere dönüşmesi karmaşık transkripsiyon faktörlerinin birbirleri arasında bağlantı kurmasıyla gerçekleşmektedir ve bu durum iki kısımda gerçekleşmektedir [21], [22]. İlk kısımda in vitro'da adipositlerin olgun adipositlere dönüşmesi için adipogenik kokteyl kullanılmasıdır. İkinci kısımda ise transkripsiyon faktörleri rol almaktadır. İkinci kısmın anahtar bileşenleri PPAR γ ve

C/EBP α 'dır, bu bileşenler direk olarak adiposit oluşumunu sağlayan gen yollarını aktive etmektedir. Hem ex vivo hem in vivo çalışmalarda, PPAR γ adipogenez sürecinde mutlaka yer almaktadır [23], [24]. PPAR γ 'nın adipogenez sürecinde yer alması ise adiposit fenotipinin oluşmasını sağlamaktadır [25]. Benzer olarak çeşitli in vivo modellerde C/EBP α , farklılaşma ve beyaz yağ dokusunun elde edilmesinde önemli bir rol oynamaktadır [26], [27]. Ayrıca C/EBP α spesifik olarak insülini stimüle etmekte ve glukoz alımını arttırmaktadır [28], [29].

Kısacası PPAR γ ve C/EBP ailesi adiposit farklılaşması için master düzenleyicidirler [30]. Hücrelerin IBMX veya deksametazona maruz kalması C/EBP β ve C/EBP γ 'nın eksprese olmasını sağlamaktadır. C/EBP β ve C/EBP γ eksprese olduğunda ise PPAR γ up-regüle olmaktadır [31], [32]. Aktif olan PPAR γ , C/EBP α 'nın ekspresyonunu indükler ve C/EBP α 'da adiposit farklılaşmasında hücrelerin olgun adipositlere dönüşmesi için gerekli olan genlerin anlatımının gerçekleşmesini sağlar [29]. Adipoz doku dışarıdan gelecek darbelere ya da enfeksiyon gibi etkenlere karşı tampon görevi görmek için iç organların çevresinde ve derinin altında konumlanmıştır. Adiposit hücreleri işlevlerine göre beyaz ve kahverengi olarak ikiye ayrılır [33].

2.1.3.2 Beyaz Yağ Dokusu

Beyaz ve kahverengi adipoz dokunun farkı; beyaz yağ dokusundaki adipositler tek yağ damlacığı şeklinde ve büyük bulunurken kahverengi yağ dokusunda birden fazla adiposit bulunmaktadır. Beyaz adipoz doku subkutanöz olarak derinin altında bulunur, özellikle karın, bacak bölgelerinde belirgin bulunurlar. Kemirgenlerde ise beyaz adipoz doku visseral olarak bulunur ve insanlardakine eşit olarak işlev görür [34].



Şekil 2. 4 Beyaz Yağ Hücresi

2.1.3.3 Kahverengi Yağ Dokusu

Kahverengi yağ dokusu, yağı depolamaz. Depolanan yağı yakarak vücutta sıcaklık sağlar. Her insanın vücudunda bulunan kahverengi yağ dokusu vücut kütle indeksi ile ters orantılıdır. Yani vücut kütle indeksi yüksek olan birinin kahverengi yağ dokusu az iken, vücut kütle indeksi düşük olan birinin kahverengi yağ dokusu fazladır [35]. Ayrıca kadın bireylerdeki kahverengi yağ dokusu erkek bireylere göre daha yüksektir. [35]. Kahverengi yağ dokusu soğuk maruziyeti ile aktive olabilmekte ve enerji harcanmasında artış meydana gelmektedir. Kahverengi yağ dokusunun artmasının glikoz metabolizması üzerinde olumlu etkileri de vardır [36].



Şekil 2. 5 Kahverengi Yağ Hücresi

2.1.4 Adipogenezde rol alan faktörler

2.1.4.1 Adipokinler

Adipokinleri adipoz dokudan iletilen sinyaller olarak özetleyebiliriz. Metabolik dokularımızda tümünden gelen uyarıları adipositlere otokrin, parakrin ve endokrin olarak iletirler. Kısacası adipokinlere hücreden sinyal taşıyan proteinler diyebiliriz [37].

2.1.4.2 Leptin

Leptin adipoz dokudan salgılanan ve tokluk hissi veren bir hormondur. Leptin gıda alımını engellemekle birlikte lipidlerin depolanmasında sınırlama sağlar. Kanda bulunan leptin yağ oranı ile doğru orantılıdır. Kanında leptin oranı yüksek birinin yağlanması yüksek olacaktır. Leptin adipositlerdeki oksidasyonu uyarır ve yağ asidi sentezinin artmasını engeller [38].

2.1.4.3 Adiponektin

Dolaşımdaki adiponektinin düşük moleküler ağırlıkta trimer yapıda, orta moleküler ağırlıklı hexamer ve yüksek moleküler ağırlıklı multimerik (12-18 merik) yapılarda olacak şekilde

farklı formları tanımlanmıştır. İnsulin duyarlılığıyla ilişkili olması ve tip 2 diyabette multimerik yapıdaki adiponektinin az olması nedeniyle, adiponektinin aktif olan formunun yüksek moleküler yapıya sahip olan formu olduğu tespit edilmiştir (Waki ve ark. 2003). Adiponektinin, bağlandığı reseptör türüne göre hücre içinde farklı sinyalizasyon yollarını aktifleştirdiği, AdipoR1 ve AdipoR2 olmak üzere iki tip reseptörü olduğu, bunlardan AdipoR1'in AMPK fosforilasyonunda, AdipoR2 nin ise PPAR- α aktivasyonunda etkili olduğu bildirilmektedir.[2]. Ayrıca, AdipoR1'in çoğunlukla iskelet kasında, AdipoR2'nin ise en fazla karaciğerde eksprese edildiği belirtilmektedir.

Adiponektin; antiinflamatuvar, insuline duyarlılık, dişilerde üremeye yardımcı etkiler olan bir adipokin olup yalnızca adipoz dokuda değil insan iskeleti ve insan kaslarında da salgılandığı belirlenmiştir[39]. Adiponektinin AdipoR1 ve AdipoR2 adında iki adet reseptörü vardır ve AdipoR1 AMPK fosforilasyonunda etkiliyken AdipoR2 ise PPAR α 'nın aktifleştirilmesinde etkilidir [40].

2.1.5 Selülitin Histopatolojisi

Selülitin patofizyolojisi hala tam olarak bilinmemektedir. Yeni patofizyolojiler yeni keşfedilen beyaz adipoz dokunun özellikleriyle keşfedilmektedir. Bu teoriye göre selülit hipertropik yağ dokusunda görünmekte ve hyalüranın fazla üretilmesiyle ilişkilidir. Selülitin histopatolojisi;

- Proteoglikan konsantrasyonunun artışı ile birlikte su seviyesinin artması ve ödem oluşumu
- Bölgesel mikrosirkülasyonda değişme; lenfoödem.
- Dokuda anormal kollejen yapının görülmesi ve yağ dokusunun kompakt hale gelmesi şeklinde görülmektedir.

Yağ dokusuyla ilgili klasik ve önemli dogmalar selülitin patofizyolojisini direk veya indirek etkiler. Bunlar;

- Her bölgesel yağ deposunda homojen dağılmış adipositleri içerir.
- Yetişkinlerde adiposit dönüşümü olmaz.
- Yağ dokusunda su ve kolajen miktarı düşüktür.

Bu dogmalar yanlış bilinen ve yenilenmeye ihtiyacı olan dogmalardır. Sadece yağ dokusundaki genel teoriler değil selülitin patofizyolojisinde etkilenmektedir. Hepsinden önce adipositler farklı bölgelerde farklı büyüklüklerde bulunabilmektedirler. Adiposit küçük veya büyük olmak üzere iki şekilde bulunabilirler [41]. İnsanlarda bulunan vücut kütle indeksine göre iki farklı tipte hücre bulunmaktadır; hipertropik (düşük selülit oluşturma kapasitesine sahip ve büyük olan adipositler) ve hiperplastik (yüksek selülit oluşturma kapasitesine sahip ve küçük hücreler). Adipositlerin %10 kadarı her yıl yenilenmektedir. Bu da her 10 yılda bir tüm yağ dokusunun yenilendiği anlamına gelmektedir. Her yıl yenilenen yağ hücresi sayısı 4 milyon ile 12 milyon arasındadır [42]. Aynı zamanda bu yenilenme ekstrasellüler matriksin yeniden modellenmesine, kollajen ve su içeriğinin rastgele biçimde değişmesine sebep olmaktadır. Yağ dokusu yapısı 1 yılda önemli ölçüde değişebilmektedirken selülitin derecesi ise 1 yıldan fazla sürede değişmektedir. Normal vücut kütle indeksine sahip insanların femoral bölgesinde (kalça bölgesinde) büyük adipositler yer almaktadır [43]. Adiposit büyüklerinin ortalamasının artması vücut kütle indeksini arttırmaktadır. Hipertropi genel olarak farklı vücut kütle indeksine sahip insanlarda görülmektedir. Selülit görüntüsünün özelliği hipertropik adipositlerin özel olarak gelişmesi ve ekstrasellüler yapısıdır.

2.2 SELÜLİT OLUŞUMUNUN GENETİĞİ

Moleküler seviyede ise mikrovasküler disfonksiyonun sebebi spesifik olan gen polimorfizmi ile ilişkilendirilir. Bu gen ise angiotensin 1- converting enzimi (ACE) dir ve SAT- yani yağ dokusundaki adipokinlerin adiponektin ekspresyonunu azaltmaktadır. Bununla birlikte, yakın zamanda, anjiyotensin-dönüştürücü enzimi (ACE) kodlayan gendeki insersiyon/ delesyon (I / D) polimorfizminin, selülit için majör genetik bir risk faktörü olarak hareket edebileceği gösterilmiştir. Kadınlarda selülit riskinin artması ACE enzimindeki D allelindeki delesyon ile ilişkilidir. Çünkü ACE enziminde D allelinde delesyon meydana geldiğinde adipoz dokudaki angiotensin 2 formasyonu artar ve buda bölgesel olarak kan akışının azalmasına sebep olarak selülit oluşmasına sebep olur [9]. İkinci bir gen ise HIF1A nın T alleli selülit gelişiminde rol oynamaktadır. Hypoxia inducible factor 1 heterodimerik bir yapıda (α/β) transkripsiyon faktörüdür. HIF1 geninin alfa alt ünitesi (HIF1A) direk olarak oksijen tansiyonu ile düzenlenir. Aşırı kalorik alım zamanlarında ve adipoz doku genişlemesinin erken aşamalarında, adipoz dokunun

mikroçevresi, yeterli vasküler ağın bulunmamasından dolayı hızla hipoksik hale gelir. Normoksik koşullar altında ise HIF1A ubiquitin-proteozom yoluyla ile hızlı bir şekilde degrade olur. Fakat hipoksik koşullarda bu molekül seviyesi hızlı bir şekilde artış gösterir [44].

Selülitler olan kadınlarda ACE ve HIF1A genlerinde dağılımı, selülit gelişimi olmayan kadınlara göre farklılık göstermektedir. İlaç çalışmalarında selülitli kadınlarda lokal ACE inhibitörlerine veya anjiyotensin II reseptörü 1 blokerlarına cevap verilmesi garanti edilmektedir. Aynı zamanda genetik faktörler bireysel olarak fibrogenik cevap ve hipoksia koşulları ile ilgilidir. Tedavi stratejisi olarak adipoz dokuya oksijen geçirgenliğini arttırmak bir strateji olabilir [13]. Çünkü selülit oluşumunun sebeplerinden bir tanesi dokuda oluşan hipoksik koşullardır. Ayrıca selülitin oluşumu kompleks ve hormonal faktörleride içermektedir. Mikrosirkülasyon sistemi, ekstrasellüler matriks, inflamatuvar alterasyonlarda adipositleri etkilemektedir [1].

2.3 SELÜLİT OLUŞUMUNUN MOLEKÜLER MEKANİZMASI VE İLİŞKİLİ MOLEKÜLLER

Adipogenik farklılaşma çeşitli transkripsiyon kaskatları ile düzenlenmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri; CCAAT/ enhancer-binding protein (C/EBP) ailesi ve üyeleri ve peroksizom proliferator-activated receptor (PPAR) γ 'dır. Adiposit farklılaşması çoklu adipogenik transkripsiyon faktörlerinde sinerjistik aksiyon göstermelidir. İlk indüklenen transkripsiyonel ağ CCAAT/ enhancer binding protein (C/ebp) ailesidir. C/ebp β ve C/ebp δ adiposit farklılaşmasının ilk evrelerinde eksprese edilir ve hemen Ppar γ ve C/ebp α nın transkripsiyonunu indüklerler [45]. Ppar γ ve C/ ebp α adiposit farklılaşmasında master düzenleyicilerdir. İki gen birlikte koordineli şekilde çalışarak adiposit spesifik genlerin ekspresyonunu sağlarlar (yağ asiti sentaz, yağ asiti bağlanma proteini, leptin ve adiponektin gibi) [46]. İnsülin ile düzenlenen GLUT4 glukoz transporterları granüllerin içerisine gömülüdür ve hücre yüzeyi membranı ile birleşerek hücre içi glukoz alımını arttırırlar bu durumda lipid damlacıklarının oluşumunu sağlar [47].

2.3.1 PPAR γ

PPAR γ ; adiposit farklılaşması, lipid metabolizması ve glukoz dengesinde yer alan birçok genin düzenlenmesinden sorumludur. Ayrıca diyabet ile ilişkili birçok genin sentezinden

PPAR γ nın sorumlu olduğu bildirilmiştir. PPAR γ ligandları adipoz dokuda yağ asit alımını ve depolanmasını sağlamaktadır. Ppar γ lingandları adipoz dokudan salınan hormonları da dzenlemektedir. PPAR γ preadipositlerin adipositlere ddnüşmesinde kritik bir transkripsiyon faktörüdür [48].

2.3.2 C/EBP

C/EBP izoformlarının yağ doku farklılaşmasındaönemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Özellikle C/EBP α 'nın yağ doku farklılaşmasındaki rolü önem teşkil etmektedir. Yağ dokusu farklılaşmaya başladığında C/EBP δ ve C/EBP β yüksek seviyelerde amlatımı gerçekleşmektedir. C/EBP α 'nın anlatımı arttığında C/EBP δ ve C/EBP β 'nın anlatımı azalmaktadır [57].

2.3.2.1 C/EBP α

C/EBP α mRNA'sı; karaciğer, yağ doku, böbrek ve akciğer de yüксе seviyede sentezlenirken, diğer dokularda daha düşük seviyelerde sentezlenmektedir [57] En önemlisi hücrel farklılaşma sırasında C/EBP α ekspresyon seviyesi yüksek seviyeler ulaşmaktadır . C/EBP α 'nın ekspresyon seviyesi hücreden bağımsız faktörler tarafından dzenlenmektedir [58].

2.3.2.2 C/EBP β

Adipogenez bir transkripsiyonel kaskat tarafından kontrol edilmektedir. Tanskripsiyonel faktörlerin büyük bir çoğunluğu CCAAT enhancer binding proteinlerdir ve adipogenezde esas rol oynar. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşması boyunca C/EBP β mitotik kolonal genişleme, epigenetik dzenleme, katlanmayan protein cevabı ve otofojide görev almaktadır. C/EBP β post-transkripsiyonel modifikasyonlarla dzenlenmektedir ve adipogenik programda bu şekilde etkili olur [59].

2.3.2.3 C/EBP γ

C/EBP γ geni neredeyse bütün dokularda eksprese olmasına rağmen, ekspresyon seviyeleri değişkelik göstermektedir. C/EBP γ 'nın ekspresyon seviyesi en fazla B hücrelerinde gerçekleşmektedir. C/EBP γ , genlerin ekspresyon seviyelerinin dzelmesinde C/EBP aktivatörleri sayesinde önemli rol almaktadır [60].

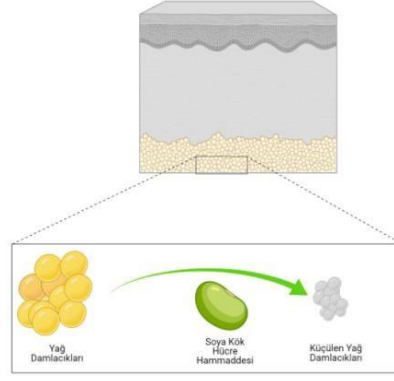
2.3.3 BİTKİ EKSTRAKTLARININ SELÜLİT İLE İLİŞKİSİ

2.3.3.1 *Bağ dokuyu güçlendiren badem*

Badem Rosaceae ailesine ait bir bitki olup cilt durumunu etkileyen egzama ve sivilce gibi bir çok hastalıkta kullanılmaktadır. Badem yağının, nemlendirici, yumuşatıcı, anti inflamatuvar ve anti-aging aktivitelerinden dolayı kozmetik sektöründe geniş kullanımı bulunmaktadır [49]. Bademin sahip olduğu zengin fenolik bileşikler sayesinde antioksidan aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur [50]. Badem kabuğu ekstresinin aynı konsantrasyondaki alfa tokoferole kıyasla oksidasyonu güçlü şekilde baskıladığı belirlenmiştir [51]. Tohum, kahverengi ince kabuk ve yeşil kabuk ekstraktlarının içerdikleri kersetin, kamferol-3-o-rutinosid, kersitrin, izoramnetin-3-glukozid ve morin sayesinde düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonunu baskıladığı ve metal iyon şelatlama aktivitesi gösterdiği raporlandırılmıştır [52]. Yapılan bir klinik çalışmada hamilelik boyunca, badem yağı ile masaj yapılan bireylerde çatlak oluşumunun azaldığı belirlenmiştir. Fareler ile yapılan bir çalışmada badem yağının UV maruziyetine bağlı foto-yaşlanmaya karşı koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir [53]. Badem reçinesinin, sıçan fibroblast hücrelerinde kolajen ifadesini arttırdığı ve kontrol grubuna göre %74,3 oranında yara iyileşmesi sağladığı bildirilmiştir [54]. Bu özelliklerinden dolayı tez kapsamında selülit karşıtı etki sağlamada bağ doku güçlendirmesi ve oksidatif strese karşı koruyucu etkisinden dolayı badem ekstraktının deneyleri gerçekleştirilmiştir.

2.3.3.2 *Adipogenezi Baskılayan Soya*

Adipogenez farklılaşmamış pre-adipositlerin tamamen farklılaşmış adipositlere dönüşüm sürecidir. Selülitin daha görünür hale gelmesinin sebeplerinden biri adiposit sayısının artışıdır. Adipoz doku kütlesi, yeni adipositlerin oluşturulması (adipogenez) ile ya da mevcut adipositlerin hacmi ile kontrol edilebilmektedir. Lipoliz ise trigliseridlerin küçük molekülü yağ asitlerine dönüşmesi ve hücreden atılması anlamına gelmektedir [19]. Dolayısıyla selülit tedavisinde lipolizin uyarımı ve yağ oluşumunun baskılanması hedeflenmektedir. Tez kapsamında adipogenezi etkili şekilde baskılayan bileşiklere sahip soya bitkisinden elde edilen ekstrakt kullanılacaktır. Soya bitkisinin major izoflavonoidlerinden biri olan genisteinin adipogenezi baskıladığı ve adipoz depolanmasını azalttığı ortaya konulmuştur [55].



Şekil 2. 6 Soya Kök Hücre Hammaddesinin Yağ Damlacıklarına Etkisi

3 MATERYAL VE METOD

3.1 3T3-L1 HÜCRELERİNİN DEVAMLILIĞI VE STOKLANMASI

Tez kapsamında kullanılan, CL-173 ve CRL2076 American Type Tissue Culture Collection' dan temin edilmiştir. CRL207 hücreleri IMDM+ %10 fetal sığır serumu ile, CL-173 hücreleri ise DMEM+ %10 fetal sığır serumu ile % 5 CO₂ içeren 37°C'de inkübatörde üretilmiştir. Hücreler 75 cm² lik petri kaplarında yetiştirilmiştir. Protein izolasyonu için 100 ve 60 mm'lik, için 60 mm'lik petri kaplarına, RNA izolasyonu uygulamaları için 25 cm² petri kaplarına, floresan mikroskobu çalışmaları için 12 kuyulu petrilere hücre ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin gece boyunca petri kaplarına yapışmaları beklendikten sonra gerekli doz uygulamaları belirlenen sürelerde uygulanmış ve 37 °C 'de % 5 CO₂ içeren etüvde bekletilmiştir.

Hücre ekimi ya da petri kabındaki hücrelerin sayılarının artması sonucu hücre pasajlanması işlemi için ortamdan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 75 cm² lik petri kaplarında 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanıp 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (% 0,25) ile CO₂ içeren etüvde 2 dakika bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda hücrelerin zarar görmesinin engellenmesi için petri kabına 2 ml besiyeri besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş hücreler santrifüj tübüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 1ml taze besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır. Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometrede 25 karede sayılan hücre sayısı, 1ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için 10⁴ ile çarpılmıştır. 1,5x10⁶ hücre, 75 cm²'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Erken pasaj sayıları olan hücreler yedeklemek amacıyla aşamalı olarak önce bir gece -80 °C buzdolabında, daha sonra uzun süre saklamak için -196 °C sıvı azot tankına alınmışlardır. Bu işlem için hücreler tripsin-EDTA ile muamele edilerek kaldırıldıktan sonra, 2000 rpm'de santrifüj edildikten

sonra sayılmış ve yaklaşık 1×10^6 hücre kriyovial tüplerde dondurulmuştur. Dondurma işlemi için % 10'luk DMSO (Dimetilsulfoksit) kullanılmıştır. Gerekli görüldüğünde hücreler sıvı azottan çıkartıldıktan sonra, hızlı bir şekilde çözündürülmüş ve önceden ısıtılarak 37 °C'ye getirilmiş besiyerinde 75 cm²' lik petri kaplarına alınmışlardır. Hücreler petri kabına yapıştıktan sonra tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüjleme işlemine tabi tutulmuş ve DMSO uzaklaştırılmıştır.

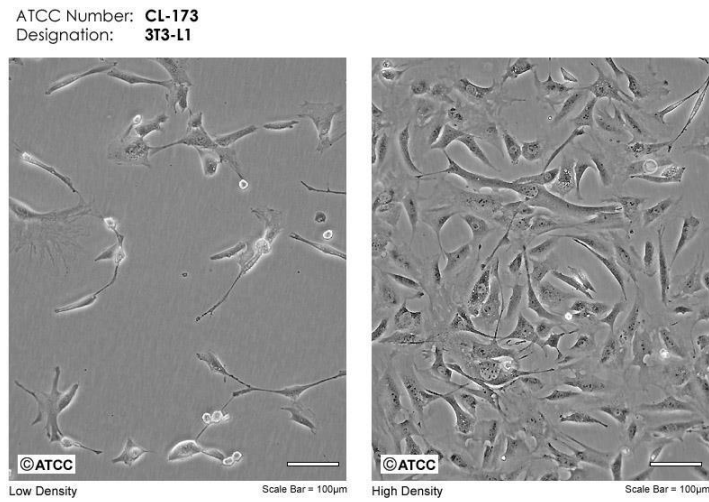
3.2 BİTKİ KÖK HÜCRE EKSTRAKTLARININ ELDE EDİLMESİ

Tez boyunca kullanılam tüm bitki ekstraktları ACTV Biyoteknoloji Laboratuvarından temin edilmiştir.

3.3 3T3-L1 HÜCRELERİNİN FARKLILAŞTIRILMASI

Hücreler %70-80 yoğunluğa gelene kadar inkübe edilir. Daha sonra tripsin ile yüzeyden kaldırılarak 12 kuyulu plakaya 40.000 hücre / kuyu olacak şekilde ekilip 48 saat boyunca yapışıp %100 yoğunluğa gelmeleri beklenir. 48. Saatin sonunda pre-adiposit büyütme besiyeri uygulanır ve yine 48 saat bekletilir. 48.saat sonunda farklılaşma besiyeri uygulanır ve 48-72 saat bekletilir. 14.günün sonunda hücrelerin mikroskop görüntüleri çekilir ve hücreler Oil Red O boyası ile boyanarak gözlemlenir.

Farklılaşma Besiyeri içeriği ise şu şekildedir: %90 DMEM, %10 FBS, 0.5 M IBMX, 1 µM Dekzametazon, 1 µg/ml İnsulin



Şekil 3. 1 3T3-L1 Hücrelerinin Mikroskop Görüntüsü [62]

3.4 SOYA KÖK HÜCRE EKSTRAKTININ DOZLARININ 3T3-L1 HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ CANLILIĞA ETKİSİNİN MTT İLE BELİRLENMESİ

Soya ve badem kök hücre ekstraktlarının sitotoksik etkisinin zaman ve doza bağlı olarak tespit edilmesi, hücre canlılığına etkisi metiltiazol difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile belirlenmiştir. Kısaca 1×10^4 hücre/kuyu 96 kuyucuklu petri kaplarında ekilip gece boyunca yapışmaları beklendikten sonra, hücrelere 0-100 μ M Soya ekstraktı 0-48 saat boyunca farklı zaman aralıklarında uygulanmıştır. Seçilen soya kök hücre ekstraktı dozunu takiben, diğer deneyler 48 saatlik periyotlarda gerçekleştirilmiştir. MTT tetrazolium tuzu ile 4 saat bekletilen örneklerde oluşan kesilmiş formazan bileşikler canlı hücrelerin yüzeyinde birikir. Bu bileşiklerin verdiği renk 570 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okumaya tabi tutulmuş ve doz uygulanmamış kontrol örneklerle oranlama yapılarak bağıl soya kök hücre ekstraktının sitotoksik düzeyi belirlenmiştir.

3.5 3T3-L1 HÜCRELERİNİN OİL RED O BOYASI İLE BOYANMASI

14. günün sonunda 3T3-L1 hücrelerini içeren kültür plakalarından besiyerleri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler %3,7'lik formaldehit ile 15 dk fikse edilmiş ve PBS ile yıkandıktan sonra Oil Red O boyası uygulanmıştır ardından plakalar 1 saat 37⁰C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile yıkayıp Oil Red O boyasının çözücüsü olan izopropil alkolden her bir kuyuya 1 ml eklenmiştir. Plakaların absorbansı 490 nm'de ölçülmüştür. Okuma sonucunda elde edilen absorbanslar kullanılarak kontrol hücreleri ve soya kök hücre ekstraktının belirli dozları ile inkübe edilen hücrelerin trigliserit miktarları hesaplanmıştır. Bu değerlendirmeler sonucunda en etkili şekilde adipogenezi baskılayan ve trigliserit miktarını azaltan soya hücre ekstraktı belirlenmiştir.

3.6 BAĞ DOKUYA ETKİLEYEN EKSTRAKTLARI BULMAK İÇİN Q-RT-PCR ÇALIŞMASI

3.6.1 Badem hücresi ekstraktının kolajen ve elastin genlerinin ifadesine etkisinin q-RT PCR analizi ile belirlenmesi

Badem hücre ekstraktının kolajen ve elastin genlerinin ifadesine etkisi CRL-2076 insan normal fibroblast hücrelerinde analiz edilmiştir. İnsan fibroblast hücreleri (CRL-2076) 25

cm² hücre kültürü flasklarına 0,5x10⁶ hücre/flask olacak şekilde 24 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda serumlu besin ortamı uzaklaştırılıp flasklara serumsuz besin ortam ile hazırlanmış ekstraktın 2 farklı dozu ve diğer flasklara yalnızca serumsuz besin ortamı eklenmiştir. 48 saat inkübasyon sonrasında plakalardaki hücrelerin RNA'ları RNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. Elde edilen RNA'lar ile cDNA sentezi yapılmış ve gen ifadedüzeyi belirlenmiştir.

3.6.2 Hücrelerden RNA izolasyonunun yapılması

RNA izolasyonu firmanın önerdiği protokole göre gerçekleştirilmiştir (E.Z.N.A. Total RNA Kit1, Omega Bio-tek). Hücreler ayrı ayrı flasklardan tripsin-EDTA ile kaldırılarak santrifüjedilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen pellet üzerine 700 µl liziz tamponu (TRK liziztamponu) ve her 1 ml liziz tamponu için 20 µl β-Mercapto etanol eklenmiştir. Hücre lizatı homojenize olması için lizat 1 ml'lik santrifüj tüpüne konulmuş ve içerisine boncuk atılarak magNa lyser (Roche) cihazında 45 saniye homojenize edilmiştir. Lizat üzerine eşit hacimde %70 etanol eklenip, dikkatlice pipetleyerek karıştırılmıştır. Örnekler spin kolonlara aktarılıp, 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Böylece lizatın spin kolona bağlanması sağlanmış ve toplama tüpünün dibine uzaklaştırılmıştır. Kolon üzerine 500 µl yıkama solüsyonu-1 eklenerek 12000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip, dipte toplanan sıvı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Kolonlar iki kez de 500 µl yıkama solüsyonu 2 ile yıkanmıştır. Kurutma işlemi için kolonlar yeni bir toplama tüpüne alınarak 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. RNA elüsyonu için kolonlar 1,5 ml'lik kapaklı mikrosantrifüj tüpüne alınmış ve kolon üzerine 40 µl su eklendikten sonra 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. RNA elüsyon işlemi RNA moleküllerinin su ile kolon filtresinden yıkanarak mikrosantrifüj tüpüne toplanması sağlanmıştır. Elde edilen RNA'ların miktarı ve saflığı nanospektrofotometre ile belirlenmiştir.

3.6.3 cDNA sentezi

Miktarları belirlenen RNA ana stokları RNaz/DNaz'sız su ile 100 ng'a seyreltilmiştir. Seyreltilen RNA'lardan cDNA kiti (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems) üreticisi firmanın önerdiği prosedüre göre cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan prosedür aşağıda basamaklar halinde listelenmiştir:

1. Kit bileşenleri buz üzerinde çözündürülmüştür.

2. Her bir cDNA sentez reaksiyonu için buz üzerinde Tablo 1 'de verilen kokteyl hazırlanmıştır.
3. Hazırlanan her bir kokteyl üzerine 10 µL 100 ng/µL RNA örnekleri nazıkçe pipetlenerek aktarılmıştır. Hacmi ve bileşenleri tamamlanan tüpler Thermal Cycler (T100, Biorad) cihazına aktarılan kadar buz üzerinde bekletilmiştir.
4. Son olarak tüpler Thermal Cycler cihazında 25 °C'de 10 dakika, 37°C'de 120 dakika, 85°C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
5. Elde edilen ana stok cDNA'lar 25 kat seyreltilerek RT-qPCR çalışmalarında kullanılmıştır.

3.6.4 Q-RT PCR Analizi

1. COL1A1 (kolajen tip I), Eln (Elastin) genlerinin ifadeleri düzeyleri tasarlanmış primer çiftleri kullanılarak SYBR green (PowerUp SYBR Green Master Mix, Applied Biosystems) yöntemi ile ölçülmüştür. COL1A1 ve Elastin genlerin ifadesinin analizinde kullanılacak olan primer dizileri Tablo 2'de verilmiştir.
2. RT-qPCR reaksiyonları Tablo 3'de açıklandığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan kokteyl, RT-qPCR 96-kuyucuklu mikrolaka içerisine, her kuyucukta 7.5 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra cDNA'lar kuyucuklara her bir reaksiyon için 3'er teknik tekrar olacak şekilde 2.5'er µL eklenerek, son hacim 10 µL'ye tamamlanmıştır. Mikrolaka, 1500 rpm'de 2 dk boyunca santrifüjlenmiştir. Son olarak RT-qPCR cihazında SYBR green üretici firmanın önerdiği termal döngü sağlanarak reaksiyon yürütülmüştür (Tablo 4).
3. Hedef genlerin (COL1A1, Eln) ifade düzeyleri, referans genin (ACTB) ifade düzeyine oranlanacak ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Schmittgen ve Livak, 2008) yöntemine göre normalize edilerek kat artışları (ing. fold change) belirlenmiştir.

Tablo 1 cDNA Sentez Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktarlar
10X RT Buffer	2 µL
25X dNTPMix (100 mM)	0.8 µL

10X RT RandomPrimers	2 µL
Multi ScribeReverseTranscriptase	1 µL
Nuclease-Free H ₂ O	4.2 µL
Toplam kokteyl hacmi	10 µL

Tablo 2 COL1A1 ve Eln genlerinin revers ve forward primer dizileri

<https://gecftools.epfl.ch/getprime>

Primer Kodu	Sekans	Sentez Miktarı
COL1A1-Forward	CTGGAAGAGTGGAGAGTACTG	100 nmol
COL1A1-Reverse	GTCTCCATGTTGCAGAAGAC	100 nmol
Elastin-Forward	ACCTCTTAAGCCAGTTCCC	100 nmol
Elastin-Reverse	CTTTATAGGCTGCAGCAGC	100 nmol

Tablo 3. RT-qPCR reaksiyon kokteylinin hazırlanışı

Malzeme	Miktarı
SYBR Green Master Mix	5 µL
ForwadPrimer	0.5 µL

ReversePrimer	0.5 µL
Nukleaz-free H ₂ O	1,5 µL
Toplam kokteyl hacmi	7,5 µl

Tablo 4. SYBR Green ile q-RT PCR termal döngüsü

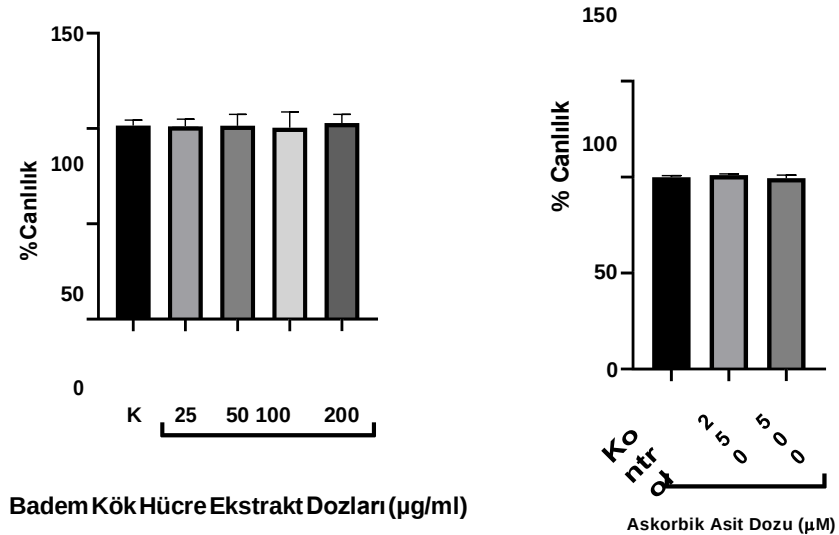
Deteksiyon formatı	SyberGreen		
Program adı		Döngüler	Analiz Modu
UDV Activation		1	None
Dual-Lock DNA Polimeraz		1	None
Annealing		40	Quantification
Melting		1	MeltingCurves
Cooling		1	None
Sıcaklık Hedefleri			
Sıcaklık (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate(°C/s)
UDG Activation			
50	None	00:02:00	4.4

Dual Lock DNA Polymerase			
95	None	00:02:00	4.4
Anneling			
95	None	00:00:15	4.4
58	None	00:00:15	2.2
72	Single	00:01:00	4.4
Melting			
	None	00:00:15	1.6
	None	00:01:00	1.6
	Continious		0.11
Cooling			
40	None	00:00:10	2.2

4 SONUÇLAR

4.1 SOYA, BADEM KÖK HÜCRE EKSTRAKTLARININ VE ASKORBİK ASİTİN HÜCRELER ÜZERİNDEKİ TOKSİSİTESİNİN BELİRLENMESİ

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi CRL2076 insan normal fibroblast hücreleri üzerinde Badem kök hücre ekstraktının 25-50-100-200 µg/ml dozları uygulanmış ve herhangi bir toksisite görülmemiştir. RT-qPCR deneylerine toksik olmayan en yüksek iki doz ile devam edilecektir. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi Askorbik asit pozitif kontrol olarak kullanılacağından toksisitesine bakılmıştır. 250 ve 500 µM dozlarında herhangi bir toksisite görülmemiştir. Şekil 4.2 ’deki 3T3-L1 fare pre-adiposit hücrelerinin üzerinde yapılan sitotoksosite sonuçlarına bakıldığında Soya kök hücre ekstraktlarının %10, %70, %80, %96 Etanol 100 ve 200 µg/ml dozlarında toksisitetlerine bakılmış ve herhangi bir toksisite görülmemiştir. Farklılaşma deneylerine bu dozlar ile devam edilecektir.



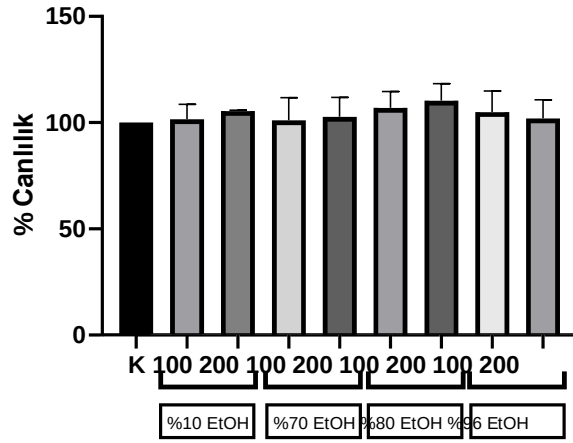
p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

Kontrole göre anlamlı farklılık yoktur.

p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

Kontrole göre anlamlı farklılık yoktur.

Şekil 4. 1 Badem Kök Hücre Ekstraktının ve Askorbik asit maddesinin CRL2076 hücreleri üzerindeki Sitotoksitesi



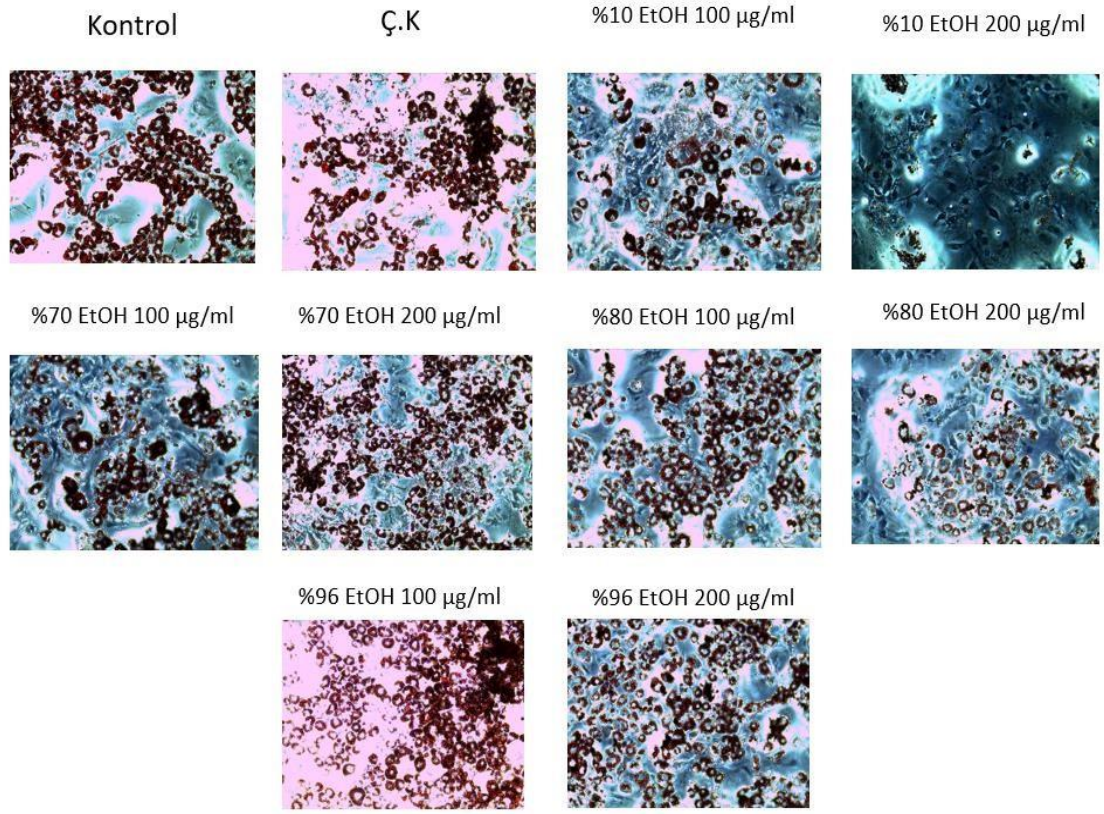
Soya Kök Hücre Ekstrakt Dozları (µg/ml)

p<0,05 olarak kabul edilmiştir.
Kontrole göre anlamlı farklılık yoktur.

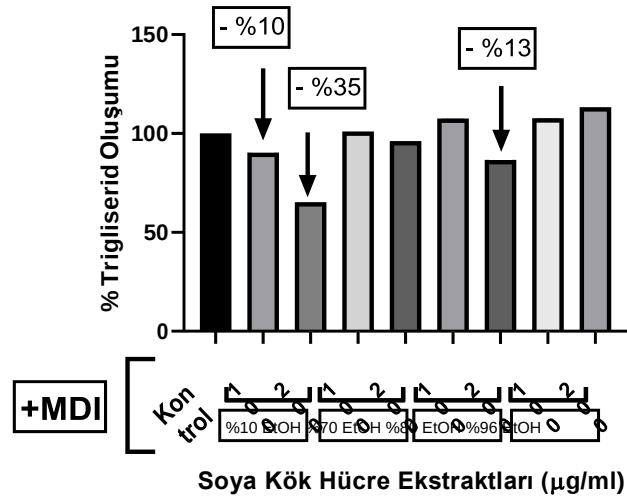
Şekil 4. 2 Soya Kök Hücre Ekstraktlarının 3T3-L1 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksitesisi

4.2 3T3-L1 HÜCRELERİNİN FARKLILAŞTIRILMASI

3T3-L1 hücrelerine farklılaşma medyumunu ile birlikte soya kök hücre %10 etanol, %70 Etanol, %80 etanol, %96 etanol ekstraktlarının 100 ve 200 µg/ml dozları uygulanmış ve bu deney 14 gün boyunca sürdürülmüştür, 14. Günü sonunda deney sonlandırılmış ve hücreler Oil Red O boyası ile boyanmıştır. Önce mikroskop görüntüleri çekilmiş ardından absorbans değerleri elde edilmek için mikropłaka okuyucuda absorbansları okunmuştur bu sonuçlara göre en etkili ekstraktın Soya %10 etanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.3'te mikroskop görüntülerine bakıldığında ve Şekil 4.4'teki absorbans değerlerine bakıldığında 100 µg/ml dozunun trigliserid oluşumunu %10 azalttığı, 200 µg/ml dozunun ise trigliserid oluşumunu %35 azalttığı belirlenmiştir. %10 etanol ekstraktın sonra en etkili ekstrakt ise %80 etanol ekstraktıdır. %80 etanol ekstraktının 100 µg/ml dozu trigliserid oluşumunu baskılamazken 200 µg/ml dozu trigliserid oluşumunu %13 baskılamıştır.



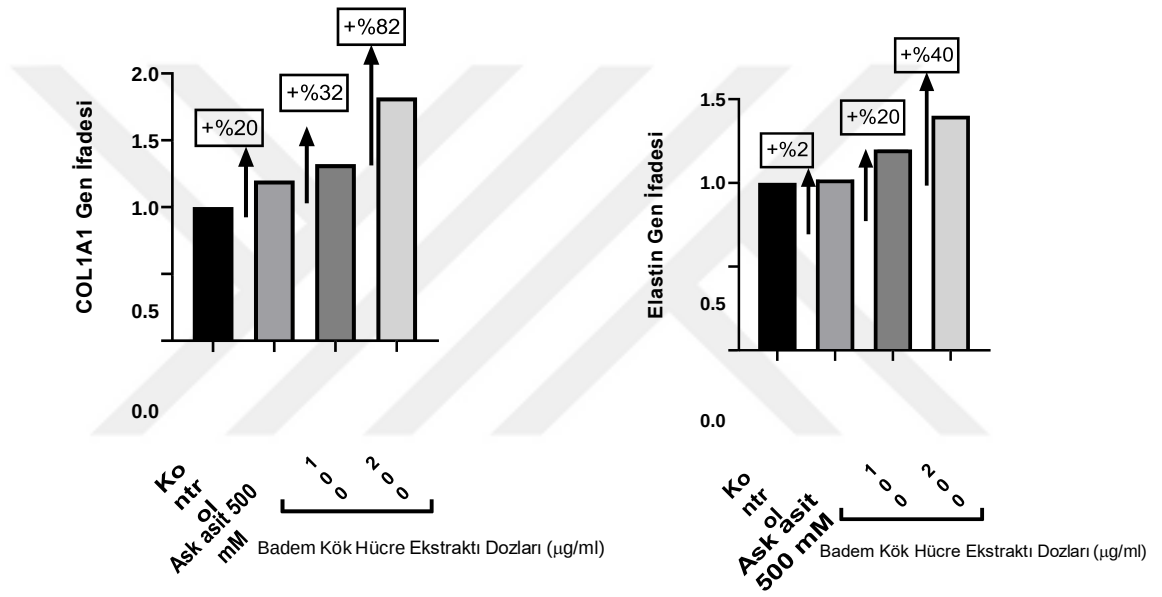
Şekil 4. 3 3T3-L1 Hücrelerinde Soya Kök Hücre Ekstresinin Yağ Oluşumuna Etkisi



Şekil 4. 4 Soya Kök Hücre Ekstraktlarının 3T3-L1 Hücreleri Üzerinde Triglicerid Oluşumuna Etkisi

4.3 BADEM KÖK HÜCRE EKSTRAKTININ KOLAJEN VE ELASTİN GENİNE ETKİSİNİN Q-RT PCR İLE BELİRLENMESİ

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi Askorbik asitin toksik olmayan yüksek dozu COL1A1 anlatımını %20 arttırırken, badem ekstraktının 100 µg/ml dozu %32, 200 µg/ml dozu %82 oranında arttırmıştır. Askorbik asitin toksik olmayan yüksek dozu Elastin anlatımını %2 arttırırken, badem ekstraktının 100 µg/ml dozu %20, 200 µg/ml dozu %40 oranında arttırmıştır.



Şekil 4. 5 Badem Kök Hücre Ekstraktının CRL2076 Hücreleri Üzerinde COL1A1 ve Elastin Gen İfadesine Etkisi

5 TARTIŞMA

Gnümüzde selülit, kadınların büyük bir çoğunluğunda (%80-90) kilodan bağımsız olarak görülen estetik bir bozukluktur. Bu bozukluğun sebebinde bulunan ana etmenler tek bir tedavi veya tek bir madde ile tedavi edilemeyen etmenler olup, bu estetik bozukluğun birden fazla mekanizmaya etki ederek tedavi edilmesi gerekir. Ayrıca selülit tedavisi için bulunan imkanların yetersizliği ve bilimsel olarak kanıtlanan az tedavinin olması selülit tedavisinin geliştirilmesi gerektiğinin göstergesidir.

3T3-L1 hücreleri pre adiposit hücreleri olup yağ metabolizması ile ilgili deneylerin yapıldığı *in vitro* bir sistemdir. Kozmetik maddelerin etkinliğini belirlerken hayvan deneyleri kullanmanın yasak olması ve etik olmamasından dolayı selülit ile ilgili çalışmaları 3T3-L1 hücreleri üzerinde *in vitro* olarak gerçekleştirmek büyük bir avantaj sağlamaktadır. CRL2076 hücreleri normal insan fibroblast hücreleri olup yaşlanma karşıtı *in vitro* deneyleri ve bağ doku ile ilgili *in vitro* deneylerin gerçekleştirilmesi için büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Soya bitkisi (*Glycine max*) baklagiller familyasından olup kısmen sarılcı, dallanmış, tek yıllık Doğu Asya kökenli bir bitkidir. Geleneksel olarak soya bitkisi proteinler için harika bir kaynaktır. Bu proteinlerin yanı sıra çeşitli mikronürientler ve fitokimyasallar içerir [61]. Soya bitkisi baklagiller ailesinin özel bir üyesidir çünkü izoflavonoidler bakımından yoğun kaynak olarak kullanılırlar [62]. Soya bitkisinin tohum ekstraktları ve taze soya sütü, kozmetik ve dermatolojide cilt tonunun eşitlenmesi, pigmentasyon ve diğer fotoyaşlanma ürünlerinde kullanılmaktadır [63]. Flavonoidler polifenolik içerikler olup bitkinin tüm bölgelerinde sentezlenirler [64]. Flavonoidler, izoflavonoidler, katekinler şeklinde kategorize edilirler [65]. İzoflavonlar flavonoidlerin büyük bir alt grubudur. Çünkü östrojenik aktiviteleri vardır ve fitoöstrojenler olarak bilinirler [66]. Soya bitkisinin içerisinde bulunan izoflavonoidlerin yağ oluşumunu inhibe ettiği bilinmektedir [67] [68].

Badem (*Prunus dulcis*), gülgiller (*Rosaceae*) familyasının Prunoideae alt familyasından meyvesi yenilebilen küçük bir ağaç türüdür. Badem Akdeniz bölgesinde yetişir. Kozmetik endüstrisinde badem yağı içeriğindeki skualen, alfa tokoferol ve beta-zosterol sayesinde cilt yüzeyinden hızlıca geçer ciltte nemlendirme ve yenileme özelliğine sahiptir [69]. Fibroblastlar kolajen salgılayan hücreler olup bağ doku ailesinin ekstrasellüler matriksine katkıda bulunan hücrelerdir. Kolojen ve elastin bağ dokunun güçlenmesinde temel rol oynayan ekstrasellüler matriks bileşenleridir [70]. Badem bitkisi içeriğinde bulunan alfa tokoferol sayesinde bağ dokuyu güçlendiren bir bitki olup genellikle kırışıklık karşıtı ürünlerde kullanılmaktadır.

Soya kök hücre ekstraktlarının sitotoksik etkisine 3T3-L1 hücreleri üzerinde bakılmış olup, Badem kök hücre ekstraktlarının sitotoksik etkisine CRL2076 hücrelerinde bakılmıştır. Ekstraktlar DMSO'da (dimetilsülfoksit) çözülmüş olup DMSO'nun etkisinden bağımsız olarak hiçbir toksisite göstermemiştir. Sitotoksik testlerinin sonucuna bakılarak en yüksek dozlar belirlenmiş olup diğer deneylere seçilen dozlar ile devam edilmiştir (Şekil 10 ve Şekil 11). Askorbik asit kolajen sentezini arttırdığı bilinen bir madde olup pozitif kontrol olarak kullanılacağından [71], askorbik asitin de sitotoksitesine CRL2076 hücrelerinde bakılmış ve hiçbir sitotoksikite gözlemlenmemiştir. 3T3-L1 hücrelerine farklılaşma medyumuna ile birlikte soya kök hücre %10 etanol, %70 Etanol, %80 etanol, %96 etanol ekstraktlarının 100 ve 200 µg/ml dozları uygulanmış ve bu deney 14 gün boyunca sürdürülmüştür, 14. Günün sonunda deney sonlandırılmış ve hücreler Oil Red O boyası ile boyanmıştır. Önce mikroskop görüntüleri çekilmiş ardından absorbans değerleri elde edilmek için mikropipetle okuyucuda absorbansları okunmuştur bu sonuçlara göre en etkili ekstraktın Soya %10 etanol ekstraktı olduğu belirlenmiştir. Hem mikroskop görünülerine bakıldığında hem de absorbans değerlerine bakıldığında 100 µg/ml dozunun trigliserid oluşumunu %10 azalttığı, 200 µg/ml dozunun ise trigliserid oluşumunu %35 azalttığı belirlenmiştir. %10 etanol ekstraktın sonra en etkili ekstrakt ise %80 etanol ekstraktıdır. %80 etanol ekstraktının 100 µg/ml dozu trigliserid oluşumunu baskılamazken 200 µg/ml dozu trigliserid oluşumunu %13 baskılamıştır. Bu sonuçlara bakıldığında en etkili soya kök hücre ekstraktının %10 etanol ekstraktı olduğu görülmektedir. Badem kök hücre

ekstraktının kullanım amacı bağ dokuyu güçlendirmek olduğundan RT-PCR ile kolajen ve elastin genlerinin anlatımına bakılmıştır. CRL2076 hücreleri üzerinde badem kök hücre ekstraktının kolajen anlatımına (COL1A1) bakıldığında; pozitif kontrol olan askorbik asitten daha etkili olduğu görülmüştür. Askorbik asitin toksik olmayan yüksek dozu COL1A1 anlatımını %20 arttırırken, badem ekstraktının 100 µg/ml dozu %32, 200 µg/ml dozu %82 oranında arttırmıştır. Askorbik asitin elastin üretimini arttırdığıyla ilgili de yayınlar mevcuttur [74]. Bu sebeple yine pozitif kontrol olarak askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asitin toksik olmayan yüksek dozu Elastin anlatımını %2 arttırırken, badem ekstraktının 100 µg/ml dozu %20, 200 µg/ml dozu %40 oranında arttırmıştır. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda Soya kök hücresinden elde edilen kozmetik hammaaddesinin trigliserid oluşumunu baskımlarken, Badem kök hücresinden elde edilen kozmetik hammaddesinin bağ dokuyu güçlendirilebileceği *in vitro* testler sonucu kanıtlanmıştır.

Literatür bilgisine bakıldığında selülit ile ilgili tedavi hedefi gösteren makalelerde çalışmamızda kullanılan yöntem gibi 3T3-L1 hücreleri farklılaştırılmış ve Oil-Red O boyası ile boyanarak madde uygulamasının yağ oluşumuna nasıl etki ettiği gözlemlenmiştir [75]. Soya maddesinin bitkisel olarak kullanılan tedavilerde yağ oluşumunu baskıladığı ile ilgili literatürde bir çok yayın bulunmaktadır. Bitkisel tedavinin çoklu etkisinin yağ dokusuna etkinliğinin bakıldığı bir yayında içerisinde soya bulunan bir karışımın 30 gün boyunca uygulandığında subkutanöz yağ dokusunda 2,8 mm'lik bir inceleme meydana geldiği görülmektedir [76]. Hammadde sağlayıcısı olan ve kozmetik pazarında büyük yeri olan Mibelle firmasının yayınında soya bitkisinin içeriğinde bulunan genistein maddesinin insan adiposit hücreleri üzerinde adipogenez oluşumuna etkisi araştırılmıştır. Yayına göre farklılaşma sırasında genistein uygulanmış adiposit hücrelerinde yağ oluşumu 3. Günü sonunda %31 baskılanmışken 5. Günü sonunda %42 baskılanmıştır [69]. Fakat bu yayında soyanın izoflavonoidi olan genistein ile direk çalışılmış, bizim çalışmamızda olduğu gibi soya kök hücre ekstraktı ile çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda ise soya kök hücre ekstraktı ile çalışılmış ve %10 etanol ile ekstrakte edilmiş soya kök hücrelerinin 200 µg/ml dozunun adipogenezini %35 baskıladığı görülmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda hedef olarak soyanın içeriğinde bulunan genistein miktarı bir kromatografi yöntemi ile belirlenip pozitif kontrol olarak genistein kullanılarak adipogenez inhibisyonuna bakılabilir. Kolajen ve elastin bağ dokunun

önemli proteinleri olup cilde elastikiyet ve sıkı bir görünüm sağlar. Selülit oluşumunun sebeplerinden biri de bağ dokunun gevşek olması ve yağ hücrelerinin bu gevşeklikten faydalanarak epidermise doğru çıkıntılar yapmasıdır. Yapılan bir klinik çalışmada hamilelik boyunca, badem yağı ile masaj yapılan bireylerde çatlak oluşumunun azaldığı belirlenmiştir. Fareler ile yapılan bir çalışmada badem yağının UV maruziyetine bağlı foto-yaşlanmaya karşı koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir [53]. Bademreçinesinin, sıçan fibroblast hücrelerinde kolajen ifadesini arttırdığı ve kontrol grubuna göre %74,3 oranında yara iyileşmesi sağladığı bildirilmiştir [54]. Literatürde bulunan makalelerde fibroblastlar üzerinde badem yağının kolajen sentezini arttırdığı da bilinmektedir [77]. Badem bitkisinin bu özelliklerinden faydalanarak bağ dokusu üzerinde olumlu bir etkisi olup olmadığı çalışmamızda yapılan deneylerle de belirlenmiştir. Normal insan fibroblast hücreleri üzerinde yapılan deneylere göre badem kök hücre ekstraktının uygulandığı hücrelerde kolajen ve elastin sentezinin arttığı görülmüştür. Böylece selülitin tedavi hedeflerinden biri olan bağ dokunun güçlendirilmesinde de badem kök hücre ekstraktının kullanılabileceği *in vitro* deneyler ile belirlenmiştir. Bu *in vitro* deneylere ek olarak kullanılan kök hücre hammaddelerinin protein düzeyinde de etkinliğinin belirlenmesi hammaddelerin etkinliği ile ilgili daha net sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

Bu hammaddelere ek olarak mikrosirkülasyonu arttıracak bir hammadenin daha etkinliği belirlenmelidir çünkü selülitin tedavi hedeflerinden bir diğeri ise mikrosirkülasyonun artırılarak selülitin tedavi edilmesidir. Ayrıca bu hammaddelerin *in vitro* deneyleri tamamlandıktan sonra etik kuruldan izin alınarak *in vivo* deneyleri de gönüllüler üzerinde test edilmeli ve bu test sonuçları görüntüsel olarak değerlendirilmelidir. Gönüllüler seçilirken her evreden selülit içeren gönüllü bireylerin seçilmesi hammaddelerin hangi evreye nasıl etki ettikleri hakkında net bir bilgi elde edilebilir. Bu araştırmalardan yola çıkılarak yapılan *in vitro* deneylere ek olarak protein düzeyinde de etkinliklerin kanıtlanması ve bu hammaddelere ek olarak mikrosirkülasyonu arttıracak bir hammadde bulunup etkinlik testlerinin *in vitro* olarak hem gen hem protein düzeyinde anlatımlarının kanıtlanması ardından bu hammaddelerden bir karışım elde edilerek her evreden selülit sahibi olan gönüllüler üzerinde *in vivo* olarak test edilmesi sonucu hammaddelerden elde edilen karışım selülit ürünü piyasaya çıkarılabilir. Türkiye’de pazarlanan ürünlerin yalnızca %10’unu Türkiye temelli ürünler oluşturmaktadır. Geri kalan %90’lık kozmetik

ve kişisel bakım ürünü ithal edilmektedir. Türkiye’de üretilecek olan kozmetik hammadelerin üretimi ciddi önem arz etmektedir. Bu sebeple tez kapsamında kozmetik sektörüne yönelik aktif hammadde geliştirilmesi hedeflenmiştir.



6 KAYNAKLAR

- [1] A. V. Rawlings, "Cellulite and its treatment", *Int J Cosmet Sci*, c. 28, sy 3, ss. 175-190, Haz. 2006, doi: 10.1111/j.1467-2494.2006.00318.x.
- [2] M. M. Avram, "Cellulite: a review of its physiology and treatment", *J Cosmet Laser Ther*, c. 6, sy 4, ss. 181-185, Ara. 2004, doi: 10.1080/14764170410003057.
- [3] M. Wanner ve M. Avram, "An evidence-based assessment of treatments for cellulite", *J Drugs Dermatol*, c. 7, sy 4, ss. 341-345, Nis. 2008.
- [4] N. Sadick ve C. Magro, "A study evaluating the safety and efficacy of the VelaSmooth system in the treatment of cellulite", *J Cosmet Laser Ther*, c. 9, sy 1, ss. 15-20, Mar. 2007, doi: 10.1080/14764170601134461.
- [5] C. Piérard-Franchimont, G. E. Piérard, F. Henry, V. Vroome, ve G. Cauwenbergh, "A randomized, placebo-controlled trial of topical retinol in the treatment of cellulite", *Am J Clin Dermatol*, c. 1, sy 6, ss. 369-374, Ara. 2000, doi: 10.2165/00128071-200001060-00005.
- [6] P. Pugliese, "Formulation of flavones and isoflavones for treatment of cellulite", US20020106388A1, Ağu. 08, 2002.
- [7] M. Rosenbaum vd., "An exploratory investigation of the morphology and biochemistry of cellulite", *Plast Reconstr Surg*, c. 101, sy 7, ss. 1934-1939, Haz. 1998, doi: 10.1097/00006534-199806000-00025.
- [8] F. Nürnberger ve G. Müller, "So-called cellulite: an invented disease", *J Dermatol Surg Oncol*, c. 4, sy 3, ss. 221-229, Mar. 1978, doi: 10.1111/j.1524-4725.1978.tb00416.x.
- [9] M. H. Khan, F. Victor, B. Rao, ve N. S. Sadick, "Treatment of cellulite: Part I. Pathophysiology", *J Am Acad Dermatol*, c. 62, sy 3, ss. 361-370; quiz 371-372, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.jaad.2009.10.042.
- [10] A. B. Rossi ve A. L. Vergnanini, "Cellulite: a review", *J Eur Acad Dermatol Venereol*, c. 14, sy 4, ss. 251-262, Tem. 2000, doi: 10.1046/j.1468-3083.2000.00016.x.

- [11] L. K. Smalls vd., “Effect of weight loss on cellulite: gynoid lypodystrophy”, *Plast Reconstr Surg*, c. 118, sy 2, ss. 510-516, Ağu. 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000227629.94768.be.
- [12] P. T. Rose ve M. Morgan, “Histological changes associated with mesotherapy for fat dissolution”, *J Cosmet Laser Ther*, c. 7, sy 1, ss. 17-19, Mar. 2005, doi: 10.1080/14764170510037743.
- [13] M. H. Khan, F. Victor, B. Rao, ve N. S. Sadick, “Treatment of cellulite: Part II. Advances and controversies”, *J Am Acad Dermatol*, c. 62, sy 3, ss. 373-384; quiz 385-386, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.jaad.2009.10.041.
- [14] J. B. Green, J. L. Cohen, J. Kaufman, A. I. Metelitsa, ve M. S. Kaminer, “Therapeutic approaches to cellulite”, *Semin Cutan Med Surg*, c. 34, sy 3, ss. 140- 143, Eyl. 2015, doi: 10.12788/j.sder.2015.0169.
- [15] O. Lupi, I. J. Semenovitch, C. Treu, D. Bottino, ve E. Bouskela, “Evaluation of the effects of caffeine in the microcirculation and edema on thighs and buttocks using the orthogonal polarization spectral imaging and clinical parameters”, *J Cosmet Dermatol*, c. 6, sy 2, ss. 102-107, Haz. 2007, doi: 10.1111/j.1473-2165.2007.00304.x.
- [16] D. Manstein, H. Laubach, K. Watanabe, W. Farinelli, D. Zurakowski, ve R. R. Anderson, “Selective cryolysis: a novel method of non-invasive fat removal”, *Lasers Surg Med*, c. 40, sy 9, ss. 595-604, Kas. 2008, doi: 10.1002/lsm.20719.
- [17] G. A. Ferraro, F. De Francesco, C. Cataldo, F. Rossano, G. Nicoletti, ve F. D’Andrea, “Synergistic effects of cryolipolysis and shock waves for noninvasive body contouring”, *Aesthetic Plast Surg*, c. 36, sy 3, ss. 666-679, Haz. 2012, doi: 10.1007/s00266-011-9832-7.
- [18] D. Hexsel ve M. Soirefmann, “Cosmeceuticals for cellulite”, *Semin Cutan Med Surg*, c. 30, sy 3, ss. 167-170, Eyl. 2011, doi: 10.1016/j.sder.2011.06.005.
- [19] F. Tırnaksız, “Selülit ve Kozmetik Uygulamalar”, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi - A : Uygulamalı Bilimler ve Mühendislik*, c. 7, sy 1, ss. 17-31, 2006.
- [20] E. Yapar, “Selülitte Topical Yaklaşımlar”, *Marmara Pharmaceutical Journal*, c. 21, ss. 54-58, Eyl. 2016, doi: 10.12991/marupj.259881.

- [21] E. D. Rosen ve O. A. MacDougald, “Adipocyte differentiation from the inside out”, *Nat Rev Mol Cell Biol*, c. 7, sy 12, ss. 885-896, Ara. 2006, doi: 10.1038/nrm2066.
- [22] R. Siersbæk, R. Nielsen, ve S. Mandrup, “Transcriptional networks and chromatin remodeling controlling adipogenesis”, *Trends Endocrinol Metab*, c. 23, sy 2, ss. 56-64, Şub. 2012, doi: 10.1016/j.tem.2011.10.001.
- [23] Y. Barak vd., “PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development”, *Mol. Cell*, c. 4, sy 4, ss. 585-595, Eki. 1999.
- [24] S. Z. Duan vd., “Hypotension, lipodystrophy, and insulin resistance in generalized PPAR γ -deficient mice rescued from embryonic lethality”, *J Clin Invest*, c. 117, sy 3, ss. 812-822, Mar. 2007, doi: 10.1172/JCI28859.
- [25] T. Imai vd., “Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, c. 101, sy 13, ss. 4543-4547, Mar. 2004, doi: 10.1073/pnas.0400356101.
- [26] “C/EBP α is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue | PNAS”. <https://www.pnas.org/content/98/22/12532> (erişim Nis. 03, 2021).
- [27] “Metabolic Response of Mice to a Postnatal Ablation of CCAAT/Enhancer-binding Protein α^* - Journal of Biological Chemistry”. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)37736-1/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)37736-1/fulltext) (erişim Nis. 03, 2021).
- [28] A. K. El-Jack, J. K. Hamm, P. F. Pilch, ve S. R. Farmer, “Reconstitution of Insulin-sensitive Glucose Transport in Fibroblasts Requires Expression of Both PPAR γ and C/EBP α ”, *J. Biol. Chem.*, c. 274, sy 12, ss. 7946-7951, Mar. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.12.7946.
- [29] Z. Wu vd., “Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity”, *Mol. Cell*, c. 3, sy 2, ss. 151-158, Şub. 1999.
- [30] S. O. Freytag, D. L. Paielli, ve J. D. Gilbert, “Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells”, *Genes Dev.*, c. 8, sy 14, ss. 1654-1663, Tem. 1994, doi: 10.1101/gad.8.14.1654.

- [31] Z. Wu, Y. Xie, N. L. R. Bucher, ve S. R. Farmer, “Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis.”, *Genes & development*, c. 9, sy 19, ss. 2350-2363, 1995, doi: 10.1101/gad.9.19.2350.
- [32] W. C. Yeh, Z. Cao, M. Classon, ve S. L. McKnight, “Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins”, *Genes Dev.*, c. 9, sy 2, ss. 168-181, Oca. 1995, doi: 10.1101/gad.9.2.168.
- [33] Ş. Demirci ve C. Gün, “Adipoz Doku ve Adipoz Dokudan Salınan Bazı Proteinler”, s. 25, 2017.
- [34] J. R. DiSpirito ve D. Mathis, “Immunological contributions to adipose tissue homeostasis”, *Semin Immunol*, c. 27, sy 5, ss. 315-321, Eyl. 2015, doi: 10.1016/j.smim.2015.10.005.
- [35] A. M. Cypess vd., “Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans”, *N Engl J Med*, c. 360, sy 15, ss. 1509-1517, Nis. 2009, doi: 10.1056/NEJMoa0810780.
- [36] F. W. Kiefer, “Browning and thermogenic programing of adipose tissue”, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, c. 30, sy 4, ss. 479-485, Ağu. 2016, doi: 10.1016/j.beem.2016.09.003.
- [37] E. E. Kershaw ve J. S. Flier, “Adipose tissue as an endocrine organ”, *J Clin Endocrinol Metab*, c. 89, sy 6, ss. 2548-2556, Haz. 2004, doi: 10.1210/jc.2004-0395.
- [38] “Leptin and the Control of Body Weight: A Review of Its Diverse Central Targets, Signaling Mechanisms, and Role in the Pathogenesis of Obesity - Oswal - 2010 - Obesity - Wiley Online Library”. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/oby.2009.228> (erişim Nis. 03, 2021).
- [39] K. Brochu-Gaudreau, C. Rehfeldt, R. Blouin, V. Bordinon, B. D. Murphy, ve M.-F. Palin, “Adiponectin action from head to toe”, *Endocr*, c. 37, sy 1, ss. 11-32, Şub. 2010, doi: 10.1007/s12020-009-9278-8.
- [40] M.-H. Lee, R. L. Klein, H. M. El-Shewy, D. K. Luttrell, ve L. M. Luttrell, “The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth”, *Biochemistry*, c. 47, sy 44, ss. 11682-11692, Kas. 2008, doi: 10.1021/bi801451f.

- [41] “Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression - PubMed”. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16754744/> (erişim Nis. 03, 2021).
- [42] E. Arner *vd.*, “Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology”, *Diabetes*, c. 59, sy 1, ss. 105-109, Oca. 2010, doi: 10.2337/db09-0942.
- [43] Y. D. Tchoukalova, C. Koutsari, M. V. Karpyak, S. B. Votruba, E. Wendland, ve M. D. Jensen, “Subcutaneous adipocyte size and body fat distribution”, *Am J Clin Nutr*, c. 87, sy 1, ss. 56-63, Oca. 2008, doi: 10.1093/ajcn/87.1.56.
- [44] “HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia - PubMed”. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10749844/> (erişim Nis. 03, 2021).
- [45] Z. Cao, R. M. Umek, ve S. L. McKnight, “Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells”, *Genes Dev*, c. 5, sy 9, ss. 1538-1552, Eyl. 1991, doi: 10.1101/gad.5.9.1538.
- [46] “Transcriptional control of adipocyte formation - PubMed”. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17011499/> (erişim Nis. 03, 2021).
- [47] D. Moseti, A. Regassa, ve W.-K. Kim, “Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules”, *Int J Mol Sci*, c. 17, sy 1, Oca. 2016, doi: 10.3390/ijms17010124.
- [48] “Regulation of PPAR γ activity during adipogenesis | International Journal of Obesity”. <https://www.nature.com/articles/0802907> (erişim Nis. 03, 2021).
- [49] S. Čolić, G. Zec, M. Natić, ve M. Fotirić-Akšić, “Almond (*Prunus dulcis*) oil”, içinde *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, M. F. Ramadan, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2019, ss. 149-180.
- [50] “Cosmetics | Free Full-Text | Main Benefits and Applicability of Plant Extracts in Skin Care Products | HTML”. <https://www.mdpi.com/2079-9284/2/2/48/htm> (erişim Nis. 10, 2021).
- [51] G. R. Takeoka ve L. T. Dao, “Antioxidant Constituents of Almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D.A. Webb] Hulls”, *J. Agric. Food Chem.*, c. 51, sy 2, ss. 496-501, Oca. 2003, doi: 10.1021/jf020660i.
- [52] S. S. K. Wijeratne, M. M. Abou-Zaid, ve F. Shahidi, “Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts”, *J Agric Food Chem*, c. 54, sy 2, ss. 312-318, Oca. 2006, doi: 10.1021/jf051692j.

- [53] “Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B–induced cutaneous photoaging in mice - Sultana - 2007 - Journal of Cosmetic Dermatology - Wiley Online Library”. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1473-2165.2007.00293.x> (erişim Nis. 10, 2021).
- [54] F. Bouaziz vd., “Healing efficiency of oligosaccharides generated from almond gum (*Prunus amygdalus*) on dermal wounds of adult rats”, *Journal of Tissue Viability*, c. 23, sy 3, ss. 98-108, Ağu. 2014, doi: 10.1016/j.jtv.2014.07.001.
- [55] “Soy Isoflavone Genistein Decreases Adipose Deposition in Mice | Endocrinology | Oxford Academic”. <https://academic.oup.com/endo/article/144/8/3315/2501922> (erişim Nis. 10, 2021).
- [56] “Physiology of Fat in the Body”, *UKEssays.com*. <https://www.ukessays.com/essays/physiology/physiology-of-fat-in-the-body.php> (erişim Nis. 17, 2021).
- [57] K. Brochu-Gaudreau, C. Rehfeldt, R. Blouin, V. Bordinon, B. D. Murphy, ve M.-F. Palin, “Adiponectin action from head to toe”, *Endocr*, c. 37, sy 1, ss. 11-32, Şub. 2010, doi: 10.1007/s12020-009-9278-8.
- [58] Z. Cao, R. M. Umek, ve S. L. McKnight, “Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells”, *Genes Dev*, c. 5, sy 9, ss. 1538-1552, Eyl. 1991, doi: 10.1101/gad.5.9.1538.
- [59] T. Alam, M. R. An, ve J. Papaconstantinou, “Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response”, *J Biol Chem*, c. 267, sy 8, ss. 5021-5024, Mar. 1992.
- [60] L. Guo, X. Li, ve Q.-Q. Tang, “Transcriptional Regulation of Adipocyte Differentiation: A Central Role for CCAAT/Enhancer-binding Protein (C/EBP) β ”, *J Biol Chem*, c. 290, sy 2, ss. 755-761, Oca. 2015, doi: 10.1074/jbc.R114.619957.
- [61] C. Cooper, A. Henderson, S. Artandi, N. Avitahl, ve K. Calame, “Ig/EBP (C/EBP gamma) is a transdominant negative inhibitor of C/EBP family transcriptional activators.”, *Nucleic Acids Res*, c. 23, sy 21, ss. 4371-4377, Kas. 1995.
- [62] “3T3-L1 ATCC ® CL-173™ Mus musculus embryo”. https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CL-173.aspx?geo_country=tr (erişim Nis. 17, 2021).
- [63] J. Henkel, “Soy. Health claims for soy protein, questions about other components”, *FDA Consum*, c. 34, sy 3, ss. 13-15, 18-20, Haz. 2000.

- [64] “Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects | The American Journal of Clinical Nutrition | Oxford Academic”. <https://academic.oup.com/ajcn/article/70/3/439s/4714906?login=true> (erişim Nis. 17, 2021).
- [65] A. F. Alexis ve V. H. Barbosa, *Skin of Color: A Practical Guide to Dermatologic Diagnosis and Treatment*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [66] R. J. Nijveldt, E. van Nood, D. E. van Hoorn, P. G. Boelens, K. van Norren, ve P. A. van Leeuwen, “Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications”, *Am J Clin Nutr*, c. 74, sy 4, ss. 418-425, Eki. 2001, doi: 10.1093/ajcn/74.4.418.
- [67] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, ve D. J. Bobilya, “Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships”, *J Nutr Biochem*, c. 13, sy 10, ss. 572-584, Eki. 2002, doi: 10.1016/s0955-2863(02)00208-5.
- [68] C. R. Cederroth ve S. Nef, “Soy, phytoestrogens and metabolism: A review”, *Mol Cell Endocrinol*, c. 304, sy 1-2, ss. 30-42, May. 2009, doi: 10.1016/j.mce.2009.02.027.
- [69] D. D. Schmid, E. Belser, S. Meister, ve M. Biochemistry, “Slimming and Tissue Strengthening: Soy Isoflavone for a Perfect Body”, s. 3.
- [70] “Soy Isoflavone Genistein Decreases Adipose Deposition in Mice | Endocrinology | Oxford Academic”. <https://academic.oup.com/endo/article/144/8/3315/2501922> (erişim Nis. 10, 2021).
- [71] A. Patzelt vd., “In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier”, *Skin Res Technol*, c. 18, sy 3, ss. 364-369, Ağu. 2012, doi: 10.1111/j.1600-0846.2011.00578.x.
- [72] Inclusive Health Medical Group ve H. Murad, “Connective Tissue Breakdown: Remodeling, Repair, and Prevention Using an Inclusive Method of Treatment”, *GGM*, c. 5, sy 3, ss. 1-8, Kas. 2019, doi: 10.24966/GGM-8662/100038.
- [73] “The Function of Ascorbic Acid in Collagen Formation”, *Nutrition Reviews*, c. 36, sy 4, ss. 118-121, Nis. 1978, doi: 10.1111/j.1753-4887.1978.tb03723.x.
- [74] J. M. Davidson, P. A. LuValle, O. Zoia, D. Quaglino, ve M. Giro, “Ascorbate Differentially Regulates Elastin and Collagen Biosynthesis in Vascular Smooth Muscle Cells and Skin Fibroblasts by Pretranslational Mechanisms *”, *Journal of*

- Biological Chemistry*, c. 272, sy 1, ss. 345-352, Oca. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.1.345.
- [75] V. Nobile, E. Cestone, F. Puoci, I. Deponti, M. Pisati, ve A. Michelotti, “In Vitro and In Vivo Study on Humans of Natural Compound Synergy as a Multifunctional Approach to Cellulite-Derived Skin Imperfections”, *Cosmetics*, c. 7, sy 2, s. 48, Haz. 2020, doi: 10.3390/cosmetics7020048.
- [76] S. A. Abosabaa, M. G. Arafa, ve A. N. ElMeshad, “Drug delivery systems integrated with conventional and advanced treatment approaches toward cellulite reduction”, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, c. 60, s. 102084, Ara. 2020, doi: 10.1016/j.jddst.2020.102084.
- [77] N. Poljšak, S. Kreft, ve N. K. Glavač, “Vegetable butters and oils in skin wound healing: Scientific evidence for new opportunities in dermatology”, *Phytotherapy Research*, c. 34, sy 2, ss. 254-269, 2020, doi: <https://doi.org/10.1002/ptr.6524>.