



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**CİLT YAŞLANMA BELİRTİLERİNİ GECİKTİRMeye YARDIMCI
BİTKİSEL EKSTRE İÇEREN LİPOZOM FORMÜLASYONLARININ
TASARLANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Saina FEIZIAZAR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**CİLT YAŞLANMA BELİRTİLERİNİ GECİKTİRMeye YARDIMCI
BİTKİSEL EKSTRE İÇEREN LİPOZOM FORMÜLASYONLARININ
TASARLANMASI**

Saina FEIZIAZAR

Danışman
Doç. Dr. Sakine Tuncay Tanrıverdi

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Kozmetoloji Bilim Dalı

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Sakine TUNCAY TANRIVERDİ

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Özgen ÖZER

Üye : Prof. Dr. Mine ÖZYAZICI



Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

Önsöz

Yüksek lisansım boyunca Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'na ait olan olanakları kullanmam konusunda desteklerini esirgemeyen, bana her koşulda yardımcı olan Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Özgen Özer'e,

Tez çalışmamda bilgi birikimi ve engin tecrübelerini benimle paylaşan ve yol göstericim olan yorumlarıyla katkı sağlayan kıymetli danışmanım Sayın Doç.Dr. Sakine Tuncay Tanrıverdi'ye,

Tez kapsamında bulunan bütün hücre kültür çalışmalarında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bu süreçte bana yol gösteren yorumlarıyla katkı sağlayan değerli hocam Sayın Prof.Dr. Petek Ballar Kırmızıbayrak ve Araş.Gör.Dr. Sinem Yılmaz'a,

Mavi ışık düzeneğini oluşturmadaki vermiş olduğu destek nedeniyle Ege Üniversitesi Elektrik ve Elektronik Mühendisliği bölüm öğretim üyesi Doç. Dr. Yavuz Öztrük'e

Tez çalışmaları esnasındaki yardımları nedeniyle tüm Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'ndaki öğretim üyelerine araştırma görevlilerine, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, ek olarak Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL) ekibine teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 13.02.2024

Saina FEIZIAZAR

Özet

Cilt Yaşlanma Belirtilerini Geciktirmeye Yardımcı Bitkisel Ekstre İçeren Lipozom Formülasyonlarının Tasarlanması

Cilt yaşlanması, genetik ve çevresel etmenlerin karmaşık bir etkileşimi sonucunda ortaya çıkan çok yönlü bir süreçtir. Deri, vücutta çok çeşitli çevresel faktörlere karşı ana savunma bariyeridir ve vücut homeostazını, savunmasını ve onarımını sürdürmekten sorumludur. İç ve dış etkenlere maruz kalmanın cilt yapısına zarar veren birçok moleküler süreci harekete geçirdiği iyi bilinmektedir.

Görünür ışık dalga boyları dermisin en derin kısımlarına nüfuz ederek farklı cilt hücrelerine ulaşır ve hücrede oksidatif stresi, hasar ve işlev bozukluğunu indükleyerek erken foto-yaşlanma belirtilerine neden olur. Foto-yaşlanmaya katkıda bulunduğu düşünülen 400-500 nm dalga boyuna sahip olan mavi ışık olarak adlandırılan, yüksek enerjili görünür (HEV) ışığın, yaşlanma belirtilerini indüklediği gösterilmiştir.

Oksidatif stresin sebep olduğu Serbest radikallerin yıkıcı etkileri ancak, antioksidanların yardımıyla indirgenebilir. Antioksidanlar, sağlığın korunması ve sürdürülmesinde çok önemli bir rol oynarlar ve aynı zamanda kozmetik ürünlerinin ayrılmaz bileşenleridir. Antioksidanların kullanımı stabilite problemleri nedeniyle formülasyonda kullanmak zordur. Antioksidanları korumak ve kozmetiklere uygulanabilirliğini genişletmek için lipozomların kullanımı en etkili çözümlerden biridir.

Depolama sırasında lipozomlarda membran füzyonu, agregasyon ve kapsüllenmiş materyalin sızması gibi stabilite sorunları olabilir. Ayrıca fosfolipidler, doymamış asil zincirlerinin peroksidasyonu veya ester bağlarının hidrolizi ile bozulabilir (Abdelwahed et al., 2006). Lipozomal toz formülasyonları, lipozomal dispersiyonlara kıyasla daha stabil ve uzun süreli saklama için daha uygundur, bu da belirli spesifik uygulamalar için gereken özelliklere daha iyi uyum sağlanmasına izin verebilir. Geleneksel lipozomların stabilite sorunları ve fizikokimyasal özellikleri bildirilmiş olsa da lipozomların biyopolimerler kullanılarak modifikasyonu veya oluşumdan sonra lipozomlara kurutma tekniğinin uygulanması, lipozomların stabilitesini ve fizikokimyasal özelliklerini geliştirmek için etkili yaklaşımlar olarak ortaya çıkmıştır.

Bu çalışmada, kurutma yöntemlerinden biri olan püskürterek kurutma yöntemi kullanarak antioksidan etkili marigold bitkisel ekstresi içeren lipozomlar tasarlanması amaçlanmıştır. Püskürterek kurutma ile oluşturulan lipozomlar kre biçiminde, partikül boyutu dağılımı homojen olan tozlar halinde elde edilir.

Tasarlanan bu formülasyonların Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve hücre canlılığı üzerinde olan etkenliğinin belirlenmesi için iki farklı hücre hattı kullanarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Cilt Yaşlanması, Marigold Ekstre, Lipozom, Antioksidan, Mavi Işık, Püskürterek Kurutma Yöntemi

Abstract

Designing Liposome Formulations Containing Herbal Extracts That Help Delay the Signs of Skin Aging

Skin aging is a multifaceted process that occurs because of a complex interaction of genetic and environmental factors. The skin is the body's main defense barrier against a wide range of environmental factors and is responsible for maintaining body homeostasis, defense, and repair. It is well known that exposure to internal and external factors activates many molecular processes that damage the skin structure.

Early indications of photoaging are caused by visible light wavelengths that reach the deepest layers of the dermis, affecting various skin cells and producing oxidative stress, damage, and dysfunction in the cell. High-energy visible (HEV) light, called blue light with a wavelength of 400-500 nm, which is thought to contribute to photo-aging, has been shown to induce signs of aging.

The destructive effects of free radicals caused by oxidative stress can only be reduced with the help of antioxidants. Antioxidants play a very important role in protecting and maintaining health and are also integral components of cosmetic products. Many of them are difficult to use in formulation due to their stability problems. The use of liposomes is one of the most effective solutions to preserve antioxidants and expand their applicability to cosmetics.

During storage, liposomes may experience stability issues such as membrane fusion, aggregation, and leakage of encapsulated material. Phospholipids can also be broken down via ester bond hydrolysis or unsaturated acyl chain peroxidation. (Abdelwahed et al., 2006). Compared to liposomal dispersions, liposomal powder formulations are significantly more stable and suited for long-term storage, which may enable greater modification to the qualities needed for particular applications. While reports of stability issues and physicochemical characteristics of conventional liposomes have emerged, the application of drying techniques or the modification of liposomes through the use of biopolymers have proven to be successful strategies for enhancing liposome stability and physicochemical characteristics.

The purpose of the study was to design liposomes containing antioxidant effective marigold herbal extract by using the spray drying method, which is one of the drying methods. Liposomes formed by spray drying are obtained as spherical powders with homogeneous particle size distribution.

To determine the effectiveness of these designed formulations on Reactive Oxygen Species (ROS) and cell viability, cell culture studies were carried out using two different cell lines.

Key Words: Skin Aging, Marigold Extract, Liposome, Antioxidant, Blue Light, Spray Drying Method



İçindekiler

Önsöz	ii
Özet	iii
Abstract	v
İçindekiler	vii
Tablolar Dizini	x
Şekiller Dizini	xi
Giriş.....	xii
GENEL BİLGİLER	1
1.1.Cilt Yaşlanması	1
1.2. Mavi Işığın Cilt Üzerindeki Etkileri	1
1.3.Antioksidanlar	3
1.4.Lipozomlar	4
1.5. Püskürterek Kurutma Yöntemi	5
1.6. Marigold Ekstresi	6
1.7.Lipitler ile ilgili Genel Bilgiler	7
1.8. Kolesterol ile İlgili Genel Bilgiler.....	7
1.9.Laktoz ile ilgili Genel Bilgiler	8
1.10.Bütil Hidroksi Toluen (BHT) ile İlgili Genel Bilgiler	8
GEREÇ VE YÖNTEM	9
2.1.Kullanılan Maddeler, Araç ve Gereçler	9
2.2. Yöntem.....	11
2.2.1.Etken Madde Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	11
2.2.1.1.FT-IR Spektrum Çalışmaları.....	11
2.2.1.2.Diferansiyel Tarama Kalorimetresi ile Yapılan Çalışmalar.....	11
2.2.1.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi	11
2.2.1.4. UV Spektrumu Analizleri	12
2.2.1.5. Termogravimetrik analiz (TGA).....	12
2.2.2.Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	12
2.2.2.1.Püskürterek Kurutmak Cihazı	12
2.2.2.1.1. Püskürterek Kurutma Yöntemi için Optimizasyonu	13
2.2.2.2. Formülasyon Optimizasyonu	13
2.2.3. Formülasyonların Karakterizasyonu	17

2.2.3.1. Formülasyonların Morfolojik Özellikleri.....	17
2.2.3.2. Formülasyonların Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) ile Yapılan Analizleri.....	17
2.2.3.3. Formülasyonların FT-IR Spektrum Analizleri.....	17
2.2.3.4. Formülasyonların Zeta Potansiyel, Partikül boyutu ve Polidispers İndisi Analizleri.....	17
2.2.4. Formülasyonların Aktivite Çalışmaları.....	18
2.4.1. Mavi Işık Yayan Düzenek Tasarlanması	18
2.2.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları	19
2.2.4.2.1.Etken Maddenin Uygun Dozun Belirlenmesi	19
2.2.4.2.2 Mavi Işığın Hücreler Üzerindeki Etkenliği.....	19
2.2.4.2.3 Mavi Işığın Uygun Zaman Aralığının Saptanması	20
2.2.4.2.4. HEkn Hücre Çalışmaları	20
2.2.4.2.5. HDFa Hücre Çalışmaları.....	21
2.2.5. Formülasyonların Stabilité Çalışmaları	21
BULGULAR	22
3.1. Etken Madde ve Yardımcı Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri	22
3.1.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi	22
3.1.2. Diferansiyel Tarama Kalorimetresi ile Yapılan Çalışmalar.....	24
3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi Bulguları.....	26
3.1.4. Ultraviyole (UV) Spektrumuna ait Bulgular.....	27
3.1.5. Termogravimetrik analiz (TGA)	27
3.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları	28
3.2.1. Püskürterek Kurutma Yöntemine ait Optimizasyon	28
3.2.2. Formülasyonların Optimizasyonu.....	28
3.3. Formülasyon Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular	29
3.3.1. Formülasyonların Morfolojik Özellikleri.....	29
Şekil 19. Optimize Formülasyonlara ait TEM Görüntüleri	29
3.3.2. Formülasyonların FT-IR sonuçları.....	30
3.3.3. Formülasyonların DSC Sonuçları	31
3.3.4. Formülasyonların Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Polidispersite İndisi ..	31
3.4. Formülasyonların Aktivite Çalışmasına ait Bulgular.....	32
3.4.1. Hücre Kültürü Çalışması.....	32
3.4.1.1. Etken Maddenin Uygun Dozunun Belirlenmesi	33

3.4.1.2. Mavi Işığın Hücre Üzerindeki Etkinlik Çalışmaları	34
3.4.1.3. Mavi Işığın Uygun Zaman Aralığının Saptanması	34
3.4.1.4. HEkn Hücreleri ile Yapılan Çalışmalar	35
3.4.1.5. HDFa Hücre ile Yapılan Çalışmalar	36
.....	36
3.5. Formülasyonların Stabilité Çalışmalarına ait Bulgular	36
TARTIŞMA	39
Sonuç ve Öneriler.....	46
Kaynaklar	47



Tablolar Dizini

Tablo 1. Cihaz Listesi	9
Tablo 2. Malzeme Listesi.....	10
Tablo 3. Kısaltma Listesi	10
Tablo 4. İlk Formülasyon Denemesi.....	14
Tablo 5. İkinci Formülasyon Denemesi	14
Tablo 6. Üçüncü Formülasyon Denemesi.....	15
Tablo 7. Dördüncü Formülasyon Denemesi	15
Tablo 8. Beşinci Formülasyon Denemesi	16
Tablo 9. Keratonosit Büyüme Kiti ve İçerikleri (ATCC; PCS-200-040)	20
Tablo 10. Optimize Formülasyonlar	29
Tablo 11. Tüm Formülasyonlara ait Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi.....	32
Tablo 12. Stabilité Öncesine Ait Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümleri.....	37

Şekiller Dizini

Şekil 1. Lipozom Yapısı (Nsairat et al., 2022).....	4
Şekil 2. Luteinin Kimyasal Yapısı(Elkholy et al., 2020)	7
Şekil 3. Büchi Mini B-290 Püskürterek kurutma Cihazı	13
Şekil 4. Formülasyon Hazırlama Prosesi	16
Şekil 5. Mavi Işık Yayan Düzenek	19
Şekil 6. Marigold Ekstresin'e ait FT-IR Spektrumu	22
Şekil 7. Laktoz'a ait FT-IR Spektrumu.....	22
Şekil 8. Kolesterol'a ait FT-IR Spektrumu	23
Şekil 9. Lipoid S100'a ait FT-IR Spektrumu	23
Şekil 10. Marigold Ekstresin'e ait DSC Spektrumu	24
Şekil 11. Kolesterol'e ait DSC Spektrumu	24
Şekil 12. Laktoza ait DSC Spektrumu	25
Şekil 13. Lipoid S 100 DSC Spektrumu	25
Şekil 14. Marigold ekstresinin Asetonitril: Metanol: Su: Etil Asetat (70:9,6:0,4:20) (h:h) içindeki YPSK Kromatogramı	26
Şekil 15. Marigold ekstresinin Hekzan: Etil Asetat (75:25) (h:h) içindeki YPSK Kromatogramı	26
Şekil 16. Marigold Ekstresinin UV Spektrumu	27
Şekil 17. Marigold ekstresine ait TGA grafiği.....	27
Şekil 18. Marigold Ekstresi Konsantrasyonun ROS Üzerindeki Etkisi.....	28
Şekil 19. Optimize Formülasyonlara ait TEM Görüntüleri	29
Şekil 20. Optimize F6 formülasyonuna ait FT-IR Grafiği.....	30
Şekil 21. Optimize F7 formülasyonuna ait FT-IR Grafiği.....	30
Şekil 22. Optimize F8 formülasyonuna ait FT-IR Grafiği.....	31
Şekil 23. Optimize Formülasyonlara ait DSC Spektrumu	31
Şekil 24. Marigold Ekstresinin Artan Konsantrasyonlarının ROS Oluşumu Üzerindeki Etkisine ait Grafik	33
Şekil 25. Marigold Ekstresinin Artan Konsantrasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisine ait Grafik	34
Şekil 26. Mavi Işığın Optimum Zaman Grafiği.....	35
Şekil 27. HEKn Hücre Çalışmalarına ait Grafik.....	35
Şekil 28. HDFa Hücre Çalışmalarına ait Grafik	36
Şekil 29. Formülasyonlara Ait Birinci Ay Renk Durumu.....	38

Giriş

Cilt yaşlanması yaştan ilerlemesiyle oluşan doğal bir süreç olmak ile beraber dış etkenler yardımı ile hızlanmaktadır. Etkenlerin en önemlisi olan UV ışınları cildin alt katmanlarına kadar etki etmektedir. Güneş radyasyonu, özellikle de ultraviyole radyasyon (UVR) yüzünden meydana gelen bu tür yaşlanma fotoyaşlanma olarak kabul edilmektedir.

Güneş ışınımının yaklaşık %50'sini oluşturan görünür ışık 400-700 nm dalga boyuna sahiptir. Spesifik olarak, mavi ışık olarak adlandırılan, 400-500 nm dalga boyuna sahip yüksek enerjili görünür (HEV) ışığın fotoyaşlanma belirtilerini indüklediği, oksidatif stresi (ROS) artışına sebep olduğu ve pigmentasyonu arttırdığı belirlenmiştir.

Günümüzde teknolojinin hayatımızdaki rolünün artışıyla bilgisayarlar, akıllı telefonlar, televizyonlar ve ışık yayan diyotlar (LED'ler) dahil olmak üzere mavi ışığa çeşitli teknolojilerden kaynaklanan bir maruziyet söz konusudur.

Mavi ışığa maruz kalan insan cildinde ROS gelişimi en zararlı yan etkilerinden biridir. Bu amaç ile kullanılan antioksidanlar biyolojik dokulardaki reaktif oksijen türlerini nötralize ederek oksidatif zincir reaksiyonlarını durdurabilen ve oksidatif hasarı erteleyebilen maddelerdir (Kumari et al., 2023)

Bu çalışmada antioksidan etkisi bilinen marigold ekstresi püskürterek kurutma yöntemi yardımı ile lipozomlara yüklenmiştir. Lipozomların daha stabil ve daha uzun süre saklanabilir olmaları için uygulanan püskürterek kurutma yöntemi Büchi Mini-B-290 cihazı yardımı ile yapılmıştır.

Etkenlik çalışmaları doğrultusunda kullanılan HDFa ve HekN hücre hatlarına uygulanan mavi ışık sonrası artan ROS miktarının marigold ekstresi içeren lipozomların bulunduğu formülasyonlarımızın etkisiyle kontrol seviyesine geri döndüğü belirlenmiştir.

Sonuç olarak marigold ekstresi içeren lipozomal toz formunun cilt yaşlanmasına neden olan ROS seviyeleri üzerinde etkenliği gösterilmiş ve kozmetik bir ürün olarak mavi ışık kaynaklı cilt yaşlanmalarının giderilmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

GENEL BİLGİLER

1.1.Cilt Yaşlanması

Yaşlanma genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen çok faktörlü bir süreçtir, Vücut kütlesi kaybı, zayıf hidrasyon, dermis ve epidermis arasındaki birleşiminin parçalanması nedeniyle ciltte oluşan kıvrım, çıkıntı ve kırışıklıktan oluşan doğal bir olgudur. Cilt, vücut ile dış çevre arasında koruyucu bir bariyer görevi görür ve bu nedenle sürekli olarak radyasyon, patojenler ve kimyasallar gibi dış faktörlere ve zararlı etkenlere maruz kalır.

Cilt yaşlanması; kronolojik yaşlanma, foto yaşlanma, hormonal eksiklik ve çevresel faktörlerin sinerjistik etkileri nedeniyle yaşla birlikte cilt kalitesinin bozulduğu bir süreçtir. Bu süreç, glikasyon, serbest radikal oluşumu, hücre döngüsü ve cilt yaşlanmasının hücresel ve moleküler mekanizması gibi çeşitli mekanizmalar nedeniyle meydana gelir.

Cilt yaşlanma süreci, hem endojen faktörlerin (gen mutasyonu, hücresel metabolizma ve hormonal faktör) hem de eksojen faktörlerin (U.V, kirleticiler, kimyasallar ve toksinler) kombinasyonu nedeniyle ortaya çıkan birçok değişikliği içerir (Avola et al., 2019).

Güneş ışığı spektrumu, ultraviyole radyasyondan (280-400 nm) görünür ışığa (400-700 nm) ve kızılötesi radyasyona (700 nm-1 mm), uzun ve düşük enerji dalga boylarına kadar kısa, yüksek enerjili dalga boylarından oluşur. Görünür ışık dalga boyları dermisin en derin kısımlarına nüfuz ederek farklı cilt hücrelerine ulaşır ve hücre oksidatif stresi, hasarı ve işlev bozukluğunu indükleyerek cilt hasarına neden olur.

1.2. Mavi Işığın Cilt Üzerindeki Etkileri

Mavi ışık, 400-500 nm dalga boylarında görünür ışık spektrumu içinde yer almaktadır. Ana kaynağı güneş ışığı olan mavi ışığa ek olarak dijital ekranlar, ışık yayan diyotlar (LED'ler) ve floresan aydınlatma söylenebilir. Mavi ışığın cilt üzerindeki negatif etkilerine ilişkin endişeler günümüzde hızla artmaktadır.

Elektronik cihazların yaygın kullanımı nedeniyle cildimiz giderek artan bir şekilde yapay mavi ışığa maruz kalmaktadır.

Mavi ışığın cilt üzerindeki etkileri, maruziyet süresi, dalga boyuna ve yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir buna göre Yüksek enerjili mavi ışığa düşük düzeyde maruz kalma, cilt sorunlarına yardımcı olmak ile sivilce gibi dermatolojik sorunların en aza indirmektedir. Öte yandan, yüksek enerjili mavi ışığa daha uzun süre maruz kalmak, DNA hasarı miktarını, hücre ve doku ölümünü ve yaralanmayı artırarak göz hasarına, cilt bariyeri hasarına, hiperpigmentasyona ve fotoyaşlanmaya neden olabilir (Coats et al., 2021).

Mavi ışığın oksidatif stres ile ilişkili sitotoksik etkiler gösterebildiğini ve hiperpigmentasyonu teşvik edebildiğini bildiren son gözlemlerle birlikte, mavi ışığa ve cilt üzerindeki potansiyel zararlı etkilerine olan ilgiyi arttırmıştır. Mavi ışığın, UVA'ya benzer şekilde, çoğunlukla doğrudan güneş ışığına maruz kalma sırasında cilt yaşlanmasına ve karsinogeneze katkıda bulunduğunu bildirilmektedir (Lorrio et al., 2020).

Deri hasarı oluşum sebebine göre ikiye ayrılır; ekstrensek (fotoyaşlanma) ve kronolojik (doğal) hasarlar. Deri tahribatının %80-90'ı UV ışını kaynaklıdır. Deri yaşlanmasının en önemli sebepleri arasında ultraviyole ışını olmakla birlikte hormonlar, tüketilen sağlıksız besinler, sigara, nemini kaybetmiş deri ve yer çekimi gibi diğer önemli faktörler de vardır. Değişik nedenlerle (stres, sigara, UV, hava kirliliği, radyasyon, ilaç yan etkileri, vb.) ortaya çıkan serbest radikallerin başta DNA olmak üzere birçok dokuda tahribata neden olarak yaşlanmada büyük bir rol oynadığı kabul edilmektedir.

Yaşlanmayı hızlandıran önemli faktörlerden biri ortaya çıkış sebepleri belli olmaksızın yaşlanma sürecini hızlandırarak hücre harabiyetine neden olan Serbest oksijen radikalleridir. Serbest radikallerin çalışma mekanizması şu şekildedir; Serbest radikaller enzimlerin faaliyetlerini inaktive eder, oksidasyon ile DNA'yı küçük parçalara ayırır ve doymamış yağları parçalarına ayırarak lipid peroksidasyonuna neden olur, yıkımlar ve karsinogeneze de başlar. Oksidatif hasar telomerleri etkileyerek telomer kısaltmalarının hızlanmasına neden olur. Bağ dokusu ve selüler matriks yıkımı yaşlanmada önemlidir. Serbest radikaller TGF-Beta etkisini, kollajen I ve III sentezini engelleyerek hasar önlemeye katkıda bulunur. Kollajenin azalmasıyla kollajenaz, jelatinaz, stromelysin-1 gibi yıkım enzimlerinde artış görülür. Ek olarak, mitokondrilerin DNA'larında da harabiyete neden olur, azalan fonksiyonlar enerjinin üretilmesine neden olur.

1.3.Antioksidanlar

Antioksidanlar cildin sağlıklı kalmasında kritik bir rol oynarlar. Cilt bakım ürünlerinde önemli bir bileşen olarak botanik antioksidan bileşikler, son zamanlarda dikkat çekmiş ve etkinliği doğrulanmıştır. Antioksidanlar topikal ürünlerde farklı amaçlarla kullanılmaktadırlar, ancak asıl işlevleri sağlıklı cilt için daha iyi koşullar yaratmaktır. Doğada, topikal bir foto koruyucu etki gösteren bol miktarda antioksidan ve doğal fenolik bileşikler içeren maddeler bulunmaktadır. Cilt için faydalı olan bu antioksidan potansiyeli maddeler yaşlanmayı geciktirici, nemlendirici, kirlilik önleyici etkiler sağlar.

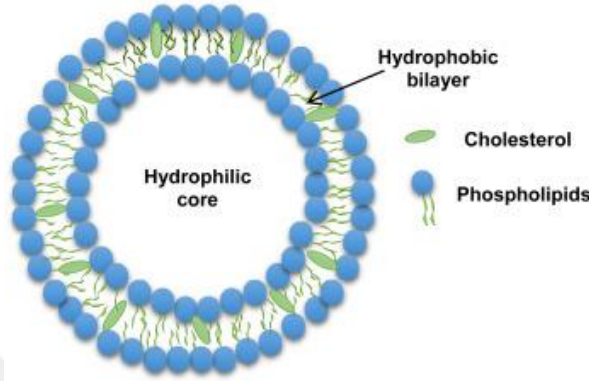
Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bile serbest radikalleri içeren oksidasyonların reaksiyon zincirlerini önemli ölçüde geciktiren veya önleyen oldukça aktif maddeler olarak tanımlanmıştır. Antioksidanların serbest radikalleri inhibe etmedeki ana etki mekanizmalarını özetlememiz gerekirse; (i) reaktif oksijen türlerini nötralize etmek, (ii) şelatlama aktivitesi, (iii) reaktif oksijen türlerini (ROS) aşırı üreten enzimlerin inhibisyonu. Kısaca, Antioksidanlar oksidatif hasar reaksiyonlarının ilerlemesini engellemede veya yavaşlatmada kritik bir rol oynar.

Normalde cilt hücreleri endojen (hücresel metabolizma) ve eksojen (UV, hava kirliliği) faktörlere maruz kalma sonucu ROS üretirler. Sağlıklı ciltte, endojen antioksidanlar serbest radikalleri anında nötralize ederek bu serbest radikaller ve endojen antioksidanlar arasında bir homeostaz oluşturmaktadırlar. Ama ROS miktarındaki artışı eksojen Antioksidanlar oral veya topikal olarak uygulanmalıdır.

Çoğu antioksidan, hava, nem, ışık, ısı, metal iyonları ve oksijen gibi bazı çevresel stres koşulları altında doğası gereği kararsız bileşiklerdir. Aslında, kozmetik formülasyonlarında birçok soruna neden olan antioksidan kararsızlığıdır. Antioksidanların kararsızlığı nedeniyle, amaçlanan raf ömrü boyunca formülasyonlardaki faaliyetlerini sürdürmek zordur, bu da onları pratik ürünlerde doğrudan kullanım için sorunlu hale getirir. İlk olarak 1961'de Alec Bangham tarafından tanıtılan lipozom, kozmetik ve farmasötik uygulamalarda aktif antioksidanların kapsüllenmesi için en yaygın taşıyıcılardan biri olarak bilinmektedir (Van Tran et al., 2019). Bu nedenle çalışmamızda antioksidan maddeyi taşıyıcı olarak lipozomal sistemler tasarlanması hedeflenmiştir.

1.4.Lipozomlar

Lipozomlar, bir veya birkaç çift katmanlı fosfolipid membran ile çevrili bir iç sulu fazdan oluşan amfifilik veziküler yapılardır. Bu amfifilik yapılar, lipozomların hem hidrofilik hem de hidrofobik maddeleri yüzey aktif maddelerle herhangi bir ilişki olmaksızın yapılarına kapsüllemelerine izin verir (Yu et al., 2021).



Şekil 1. Lipozom Yapısı (Nsairat et al., 2022)

Lipozomların ana bileşenleri (genel olarak, fosfatidilkolin ve kolesterol) yüzey aktif madde özelliklerini taşımazlar, bu da biyoyumlulukları, biyolojik olarak parçalanabilir ve düşük toksisiteyi nedeniyle lipozomları insanlar için en güvenli ve en uygun dağıtım sistemi haline getirir. Lipozomların ilaçlar, vitaminler, antioksidanlar ve antibakteriyel maddeler gibi kararsız bileşikler kapsülleme yeteneğinin, yüksek kapsülleme verimliliği, yüksek çözünürlük ve aktif bileşiklerin artan biyoyararlanımı ile yüksek koruma kapasitesi gibi sayısız avantajlara sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu avantajlar, nihai olarak, etki bölgesinde etkili bir kontrollü salım özelliğine sahip dağıtım sistemleri olarak lipozomların kabiliyetini de artırır.

Lipozomlar, ince film hidrasyon teknikleri, etanol enjeksiyonu, mikro akışkan teknolojisi, ısıtma, yüksek kesme dispersiyonu, sonikasyon yöntemi gibi yöntemler kullanılarak formüle edilmekteler. Bahsi geçen yöntemler, formülasyonlarda kullanılacak aktif bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri gibi parametrelere göre lipozom hazırlanması için kullanılmaktadırlar (Shin et al., 2015).

Taşıyıcı sistemler arasında, biyoyumlulukları, sürekli salım potansiyelleri ve hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşikler taşımaya yönelik çekici yetenekleri nedeniyle

lipozomlar uzun zamandır çok ilgi görmüştür. Lipozomlar fosfolipidlerin sulu çözelti içinde dağıldığı, ardından kendi kendine bir araya gelerek parçacıkların iki katmanlı membranını oluşturduğu kolloidal sistemlerdir.

Depolama sırasında lipozom dengesizleşmesi, membran füzyonu, agregasyon ve kapsüllenmiş materyalin sızması gibi değişikliklere neden olabilir. Ayrıca fosfolipidler, doymamış asil zincirlerinin peroksidasyonu veya ester bağlarının hidrolizi ile bozunabilirler. Lipozomal toz formülasyonlar, lipozomal dispersiyonlara kıyasla daha stabil ve uzun süreli saklama için daha uygundur, bu da belirli spesifik uygulamalar için gereken özelliklere daha iyi uyum sağlanmasına izin verebilir (Ingvarsson et al., 2011). Bu nedenle tez çalışmada püskürterek kurutma yöntemi kullanılarak toz formunda lipozomal sistemler elde edilmiştir.

1.5. Püskürterek Kurutma Yöntemi

Püskürterek kurutmada sıvı numuneler sıcak hava ortamına püskürtülerek ve numunedeki sıvı fazın uzaklaştırılması ile ürünün toz halinde eldesine dayanır. Bu yöntemde cihaza örnekler süspansiyon, emülsiyon veya solüsyon halinde verilebilir. Cihazdan alınan ürün partikül veya granül halindedir. Elde edilen ürünün şekli beslemenin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile kurutucu özelliğine ve operasyon şartlarına bağlı olarak değişir.

Püskürtmeli kurutucunun patenti 1872 yılında Samuel Percy tarafından alınmıştır. Endüstride ilk kullanımı ise 1920'li yıllarda süt tozu ve deterjan üretimi olmuştur. Bu aşamadan sonra püskürtmeli kurutma gıda, ilaç, kozmetik, ziraat ve kimya sanayilerinde yaygın olarak kullanılmıştır.

Püskürterek kurutma daha önce esas olarak bir dehidrasyon işlemi olarak düşünülse de son eğilimler bu tekniği günümüzde hidrofilik ve hidrofobik aktif bileşiklere içine alan çeşitli farmasötik taşıyıcıları tasarlamak için bir araç olarak uygulamaktadır. Püskürtmeli kurutma ile küresel formda, tekdüze partikül boyutu dağılımına sahip toz ürün elde edilir. Başka kurutma yöntemlerine kıyasla avantajı kurutma süresinin daha kısa olması ve bunun sonucunda sıcaklığa hassas ürünlerin kurutulmasına imkân sağlamasıdır. (Barbosa-Cánovas, 2005).

Hazırlanan lipozomlara son işlem tekniklerinin uygulanmasının amacı, genel olarak, sulu lipozomlara kıyasla daha yüksek stabiliteye sahip kurutulmuş lipozomlar geliştirmektir. Dondurarak kurutma, püskürterek kurutma ve püskürterek dondurarak

kurutmayı içeren yaygın işlem sonrası tekniklerinin lipozomların stabilitesi ve biyoyararlanımı arttırmak için kullanılmaktadır. Dondurarak kurutma ile karşılaştırıldığında, spreyci kurutma işlemi daha hızlı, daha ucuz ve tanımlanmış parçacıkların üretimi için daha uygundur.

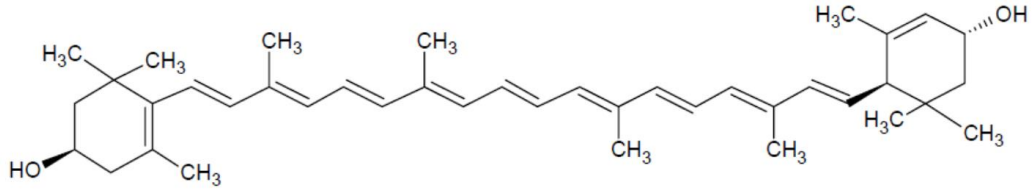
1.6. Marigold Ekstresi

Marigold ekstresi diğer adıyla Kadife çiçeği (*Tagetes erecta* L.), anti oksidan ve anti-kanser aktiviteleri gösteren ve göz sağlığına faydalı olan lutein adı verilen ksantofil açısından zengin bir kaynaktır. Lutein, karotenoid ailesine, yani ksantofillere ait sarı bir bitki pigmentidir (Şivel et al., 2014). Meksika, Peru, Ekvador, İspanya, Hindistan veya Çin'de ticari amaçlarla yetiştirilmektedir. Kurutulmuş Kadife çiçeği çiçekleri %0,1-0,2 karotenoid içerir ve bunların %80'i lutein diesterleridir(Boonnoun et al., 2012)

Luteinin iki önemli şekilde işlev gördüğüne inanılmaktadır: birincisi yüksek enerjili mavi ışığın filtresi olarak, ikincisi ise ışık kaynaklı reaktif oksijen türlerini (ROS) söndüren ve temizleyen bir antioksidan olarak. Lutein ultraviyole radyasyonlarının göz retinasında oluşturduğu serbest radikallerin nötralize edilmesinde etkili bir rol oynayarak, gözlerin korunmasında etkili bir antioksidan olarak bilinmektedir Kanıtlar, lutein tüketiminin yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD) ve katarakt gibi göz hastalıklarıyla ters ilişkili olduğunu göstermektedir.

Bu, luteinin (ve bir stereo izomer olan zeaksantin) lenste ve retinanın merkezi ve yüksek keskinlik görüşünden sorumlu bölgesi olan makula luteada biriktiğinin bulunmasıyla desteklenmektedir. Çalışmalar, lutein takviyesinin, AMD ve diğer oküler hastalıkları olan hastalarda maküler pigmentin artmasına ve görmenin iyileşmesine yol açtığını göstermektedir. Lutein ayrıca cildi UV kaynaklı hasarlardan korumaya da hizmet edebilir ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltmaya yardımcı olabilir(Alves-Rodrigues & Shao, 2004).

Luteine ait yapısal formülü Şekil 1'de gösterilmektedir.



Şekil 2. Luteinin Kimyasal Yapısı(Elkholy et al., 2020)

1.7.Lipitler ile ilgili Genel Bilgiler

Lipoid S100 diğer adıyla soyadan elde edilmiş fosfolipitler, ham soya fasulyesi lesitininden saflaştırılarak elde edilmektedir (lipoid S100; PC > %96). Bu fosfolipitler farmasötik ve kozmik alanları yanı sıra sağlıklı beslenme açısından da oldukça zengin maddelerdir.

Lesitinler genellikle farmasötik ürünlerde, kremler ve merhemler gibi topikal ürünlerde kullanılan dağıtıcı, emülsifiye edici ve stabilize edici maddeler olarak kullanılır. Serbest yağ asidi içeriğine bağlı olarak fiziksel formları viskoz yarı sıvılardan tozlara kadar farklılaşmaktadır. Lesitin, hücre zarlarının bileşenlerinden biri olduğundan ve cilt hücrelerinden geçirgenliği arttırdığından topikal formülasyonlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Lipozomal sistemlerin ana yapım malzemesi ve teknik yardımcı madde olmalarının yanı sıra çözücü, ıslatma maddesi ve emülgatör olarak kullanılmaktadır. Fosfolipitler kaynaklarına göre yumurta fosfolipiti, soya fasulyesi fosfolipiti ve ayçiçeği fosfolipitleri olarak formülasyonlarda kullanılmaktadırlar.

1.8. Kolesterol ile İlgili Genel Bilgiler

Kolesterol, lipozom bileşiminde stratejik bir rol oynar. Kolesterol amfifilik yapıya sahip organik bir sterol molekülüdür. Yapısal olarak bu molekül, fosfolipidlerle hidrojen bağları oluşturabilen bir hidroksil grubuna ve esnek bir karbonhidratla hacimli steroid halkasına sahiptir.

Kolesterol, ökaryotik hücre zarında bulunan 27 karbonlu bir moleküldür ve hücre zarındaki konsantrasyonu, tüm lipid bileşiklerinin yaklaşık %30-50'dir. Membran geçirgenliğinin düzenlenmesi, elastikiyet ve sertlik ve membran mukavemeti dahil olmak üzere kolesterole çeşitli hayati roller atfedilmiştir. Kolesterol, lipozomların formülasyonunda en çok kullanılan sterol olup, lipozom agregasyonunu önleyebilir ve

lipozomal membranın stabilitesini geliştirebilir. Kolesterol, lipit çift tabaka dinamiğinin kritik bir düzenleyicisidir ve hücrelerin normal işleyişi için gereklidir. Küçük moleküllere pasif geçirgenliğin azalması, kolesterolün membran fosfolipitleriyle etkileşiminden kaynaklanır ve membran yapışmasını arttırır. Deneysel çalışmalara göre, lipozom çift katmanlarına eklenen kolesterol, ek bir dengeleyici etki olarak sayılabilecek lipit değışimini önleyebilmektedir (Jimenez-Escrig SC & Sanchez-Muniz Ph D Prf, 2000).

1.9.Laktoz ile ilgili Genel Bilgiler

Laktoz, püskürterek kurutma yöntemi ile oluşturulan lipozomların yapımında kullanılan en yaygın yardımcı madde türlerinden biridir. FDA onaylıdır, toksik değışildir, kolayca parçalanabilir ve yeterince yüksek bir cam geçiş sıcaklığına sahiptir (yaklaşık 101°C).

Genel olarak, püskürterek kurutmalı laktoz çözeltileri, su damlacıklardan hızla buharlaştığından amorf parçacıklar üretecektir, bu da laktozun kristalleşme süresini sınırlandırır. Amorf laktozun stabilitesi zayıftır, ortamdaki nemi hızla emer ve yeniden kristalleşir. Öğütölmüş inhalasyon laktozu, düzensiz şekilli parçacıklara ve yapışkan akış özelliklerine sahip, oldukça tutarlı bir kristal laktozdur (Le et al., 2012).

1.10.Bütil Hidroksi Toluen (BHT) ile İlgili Genel Bilgiler

Organik yapıda bir bileşiktir ve 2-6 tersiyer bütil bileşiği ile modifikasyonu sonucu elde edilen 4-Metilfenol bileşiğinden meydana gelmektedir. Antioksidan özellikleri yüksektir. Kozmetik, farmasötik ve gıda sektöründe sıklıkla antioksidan olarak kullanılmaktadır. Genel olarak güvenli madde (GRAS) kategorisinde bulunmaktadır. Ek olarak, gıda sektöründe de kullanımına belirli ölçülerde FDA tarafından izin verilmektedir. Katı ve sıvı formdaki yağların oksidasyonu sonucu acılaşmasını ve yağda çözönen vitaminlerin etkenlik kaybını önler. Ürünlerdeki kullanım limitleri %0.5 ile %1.0 arasındadır (Rowe et al., n.d.). BHT, kozmetik ürünlerin, farmasötik ürünlerin, yağda çözönen vitaminlerin stabilitesini arttırmak için kullanılan sentetik bir antioksidandır.

Suda çözönlörlöğü yoktur. Etanol, metanol ve 2-propanol içerisinde kolay çözönmektedir. Bütilenmiş hidroksitoluen karakterizasyonu şu şekildedir; beyaz veya açık sarı renge sahip kristal katı veya toz halindedir. Kendine has hafif fenolik kokuya sahiptir. Moleküler ağırlığı 220.35 g/moldür.

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.Kullanılan Maddeler, Araç ve Gereçler

Tez çalışmalarım kapsamında kullanılan malzemeler ve ekipmanlar aşağıda listelenmiştir. Tablo 1’de ekipmanlar, Tablo 2’de malzemeler, Tablo 3’te kısaltmalar listelenmiştir.

Tablo 1. Cihaz Listesi

Cihaz Adı	Marka/Model	Menşei
Terazi	Mettler Toledo ML	Amerika
Manyetik Karıştırıcı	Stuart US152	Almanya
Fourier Transform Infrared (FT-IR)	Perkin Elmer Spectrum 100	Amerika
Diferansiyal Tarama Kalorimetresi (DSC)	Perkin Elmer DSC 6000	Amerika
HPLC UV dedektörlü	Agilent 1100-1200 serisi	Amerika
ACE C18 Kolon	ACE	İngiltere
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph	Almanya
Spray Dryer cihazı	Buchi B-290	İsviçre
Manyetik Karıştırıcı	Thermo Scientific	Amerika
Stabilite Kabini	Nüve TK 252	Türkiye
Partikül size/zeta	Malvern	İngiltere
İnkübatör	Nuvair	Türkiye
ILX Lightwave Optical Power Meters	OMM-6810B-	Amerika
Vorteks	VMR International	Amerika
Saf Su Cihazı	Sartorius Stedim	Almanya
Etüv	Nüve EN 400	Türkiye
Mekanik Karıştırıcı	Janke & Hunkel	Almanya

Tablo 2. Malzeme Listesi

Malzeme İsmi	Menşei
Marigold Ekstresi	Jiwan Pharmatech
Lipoid S 100	Lipoid
Kolestrol	Merck
Laktoz	DFE Pharma
Bütil Hidroksi Toluen (BHT)	Merck KGAA
Etanol	Isolab
Resveratrol	Merck
Trehaloz	DFE Pharma
HEkn Hücre Hattı	ATCC
HDFa Hücre Hattı	Gibco

Tablo 3. Kısaltma Listesi

Kısaltmalar	
Reaktif Oksijen Türleri	ROS
Yaşa Bağlı Makula Dejenerasyonu	AMD
Diferansiyal Tarama Kalorimetresi	DSC
Fourier Transform Infrared	FT-IR
Bütil Hidroksi Toluen	BHT
Etanol	EtOH
Ultraviyole	UV
Termogravimetrik analiz	TGA
Polidispersite İndeksi	PDI

2.2. Yöntem

2.2.1.Etken Madde Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

2.2.1.1.FT-IR Spektrum Çalışmaları

Marigold ekstresi, kolesterol, lipoid S100, laktoz yardımcı maddelerinin Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrum analizi 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığı alınarak, 25° C oda sıcaklığında çalışılmıştır.

2.2.1.2.Diferansiyal Tarama Kalorimetresi ile Yapılan Çalışmalar

Etken maddenin, kolesterol, lipoid S100 ve laktozun fiziksel birebir karışımının Diferansiyal Tarama Kalorimetresi (DSC) ile analizleri gerçekleştirilmiştir. DSC analizi için yapılan çalışmada numuneler, 10^{-5} hassasiyetle 4 mg civarında tartılıp, basınç ile alüminyum örnek kabında kapaklar birleştirildi. 30°C'den 10°C/dak aralıklarıyla 300°C'ye kadar yükseltildi ve analiz sırasında alüminyum referansı kullanılarak 50 mL/dak hızda azot gazı akış hızı ile gerçekleştirildi.

2.2.1.3.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi

Marigold ekstresi'in miktar tayini ve salım hesaplamalarında YPSK cihazı kullanılarak analitik yöntem geliştirme çalışmaları gerçekleştirildi. YPSK sistemini oluşturmak için otomatik örnekleyici, kolon fırını, degaz ünitesi, UV lamba ve kolon fırını kullanılan (Agilent 1100-1200 serisi). C18 (ACE 5 C18, 250 mm, 4.6 mm, 5 μm) kolon analizler için kullanılmıştır. Mobil faz, Asetonitril: Metanol: Su: Etil Asetat karışımı (70:9,6:0,4:20) (h:h) olacak şekilde hazırlanmıştır ve degaz edilmiştir.

Akış hızı 1.0 mL/dk 37 °C kolon sıcaklığında 10 μL örnek hacmi ile 60 dakika boyunca enjeksiyon verilmiştir. Okumalar 450 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

Uygun analitik yöntemi geliştirmek için birden fazla YPSK yöntemi kullanılmıştır. İkinci yöntem için; Zorbax RX-SIL (250 mm, 4.6 mm, 5 μm) kolon analizler için kullanılmıştır. Mobil faz çözeltisi Hekzan: Etil Asetat karışımı (75:25) (h:h) olacak şekilde hazırlanmıştır ve degaz edilmiştir.

1.3 mL/dk akış ile 20°C'deki kolon sıcaklığında 10 μL örnek hacmi ile 50 dakika süresince analiz sisteme enjeksiyon verilerek yapılmıştır. Maksimum absorbans gösteren 446 nm dalga boyu seçilerek okuma yapılmıştır.

2.2.1.4. UV Spektrumu Analizleri

Marigold ekstresi Ultraviyole (UV) spekturumu ölçümü için 10 mg etken madde, 9 mL etanolde çözündürülerek 10 mL'ye 1 mL kloroform ile tamamlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltinin maksimum absorbandsı (λ_{max}), 1 cm'lik kuvartz küvetlerde UV spektrofotometre cihazı ile dalga boyu taraması yapılarak belirlenmiştir.

2.2.1.5. Termogravimetrik analiz (TGA)

Marigold ekstresinin termal stabilitesi termogravimetrik analiz yöntemiyle Perkin Elmer TGA-4000 cihazı yardımı ile belirlenmiştir. Yaklaşık 4 mg ağırlığında tartılan örnekler bir cihaz haznesine yerleştirilerek 10°C/dk hızında 30°C'den 400°C'ye kadar ısıtılmış ve maddenin ağırlık değişimleri belirlenmiştir.

2.2.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

2.2.2.1. Püskürterek Kurutmak Cihazı

Bu tez çalışmasında lipozom üretim yöntemi olarak püskürterek kurutma ile lipozomların eldesi yöntemi seçilmiştir. Lipozomal toz formülasyonlarını hazırlamak için Büchi Mini-SprayDryer B-290 (Büchi, İsviçre) kullanılmıştır. Bu cihazın temel kısımları hava ısıtıcı, atomizer, kurutma haznesi ve nihai ürünlerin alındığı toplama kısımlarıdır. Formülasyonların hazırlanması için farklı işlem parametreleri optimize edilerek uygun parametreler belirlenmiştir.

Cihazın çalışma prensibi öncelikle sıvının besleme atomizerine pompalanmasına dayanmaktadır. Verilen örnek atomizer ile sıcak ortama (genellikle sıcak hava) püskürtülür. Verilen örneğin sıcak ortamla temas etmesiyle nem buharlaşır ve damlacıklar kurur. Elde edilen kuru ürün toplama kabından alınır. Püskürterek kurutma cihazının çalışma aşamaları kuru toz eldesi ile tamamlanır (Bhandari, 2013). Şekil 3'de sistem görülmektedir.



Şekil 3. Büchi Mini B-290 Püskürterek kurutma Cihazı

2.2.2.1.1. Püskürterek Kurutma Yöntemi için Optimizasyonu

Püskürterek kurutma yöntemi ile marigol ekstresi içeren lipozomlar hazırlanmıştır. Bu süreçte farklı işlem parametreleri denenerek optimum parametreler belirlenmiştir. Lipitler ve diğer bileşenler uygun çözücüde çözündürülmüş ve sisteme pompalanmıştır. Kurutma işlemi sırasında giriş sıcaklığı 120°C'ye, aspiratör hızı %100'e, besleme pompası hızı 12mL/dk'ya ayarlanmış, bu da 75-85°C arasında değişen bir çıkış sıcaklığı sağlamıştır.

2.2.2.2. Formülasyon Optimizasyonu

Tez çalışmasında etken madde olarak marigold ekstresi kullanılmıştır. Marigold ekstresinin sudaki ve etanoldeki çözünürlüğü literatürden araştırılmıştır. Marigoldun bileşenlerinden olan lutein maddesi bizim çalışmamızın ana etken maddesi olduğundan luteine ait çözünürlükler baz alınmıştır. luteinin etanoldeki çözünürlüğü 0.3 mg/mL olarak bulunmuştur.(Craft & Soares, 1992) Aşağıda, yapılan her bir çalışmaya ait formülasyon geliştirme çalışmaları anlatılmıştır.

Formülasyon 1: A karışımı olarak lipoid S100 ve kolesterol 50 mL etanol içerisinde çözündürülmüştür. B karışımı olarak da Trehaloz 50 mL saf su yardımı ile çözündürülmüştür. A ve B karışımları manyetik karıştırıcı yardımı ile 15 dk boyunca

kariştırılmıştır. Bu denemenin görüntüleme sonuçları trehalozun bizim lipozom oluşturma yöntemimiz için uygun olmadığını göstermiştir. Ayrıca bu formülasyon denemesinde pompalama hızı (12mL/dk) dan (20 mL/dk) ya yükselti miş ve optimum hızı bulmak için denemeler devam etmiştir.

Tablo 4. İlk Formülasyon Denemesi

Lipoid S100	%0,1
Kolestrol	%0,025
Trehaloz	%0,04
Etanol:su (50:50)	100mL

Formülasyon 2: Lipoid S100 ve kolesterol 2 mL etanol yardımıyla 70 C sıcaklık verilerek 3 dakika boyunca   z nd r lm ştir.  zerine 5 mL su ile tamamlama yapılarak 2 dakika boyunca sonikatörden (2dk.2cycle.100% g  ) geçirilmiştir ve 88 mL su ile tamamlama yapılarak 2 dakika manyetik kariştırıcı yardımı ile üzerine eklenmiş laktozun karişması sağlanmıştır. 24 saat bekleme sonrasında püskürterek kurutma cihazına verilmeden önce tekrardan sonikatörden geçirilmiştir.

Tablo 5. İkinci Formülasyon Denemesi

Lipoid S100	%0,1
Kolestrol	%0,025
Laktoz	%5
Etanol:su (2:98)	100mL

Formülasyon 3:

Lipoid S100 ve kolesterol 50 mL su ile kariştırılmıştır. Manyetik kariştırıcı yardımı ile 80 C’de 2 saat boyunca kariştırılmış ve sonikatörden geçirildikten sonra laktoz eklenmiş ve 50 mL etanol ile tamamlama yapılmıştır.

Tablo 6. Üçüncü Formülasyon Denemesi

Lipoid S100	%0,1
Kolestrol	%0,025
Laktoz	%5
Etanol:su (50:50)	100mL

Formülasyon 4:

Elimizde etken maddenin az olmasından kaynaklı ilk olarak denemelere resveratrol etken maddesi kullanılarak başlanmıştır. Lipoid S100, kolesterol ve resveratrol 2 mL etanol yardımıyla 70°C sıcaklık verilerek 3 dakika boyunca çözündürülmüştür. Üzerine 5 mL su ile tamamlama yapılarak 2 dakika boyunca sonikatörden (2dk.2cycle.100% güç) geçirilmiştir ve 88 mL su ile tamamlama yapılarak 2 dakika manyetik karıştırıcı yardımı ile üzerine eklenmiş laktozun karışması sağlanmıştır. 24 saat bekleme sonrasında püskürterek kurutma cihazına verilmeden önce tekrardan sonikatörden geçirilmiştir.

Tablo 7. Dördüncü Formülasyon Denemesi

Lipoid S100	%0,1
Kolestrol	%0,025
Laktoz	%5
Etanol:su (2:98)	100mL
Rezveratrol	%0,04

Formülasyon 5:

Lipoid S100, kolesterol ve marigold ekstresi 50 mL su ile karıştırılmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımı ile 80°C de 2 saat boyunca karıştırılmış ve sonikatörden geçirildikten sonra laktoz eklenmiş ve 50 mL etanol ile tamamlama yapılmıştır. Bu formülasyon etken madde içeren ilk deneme olmuştur.

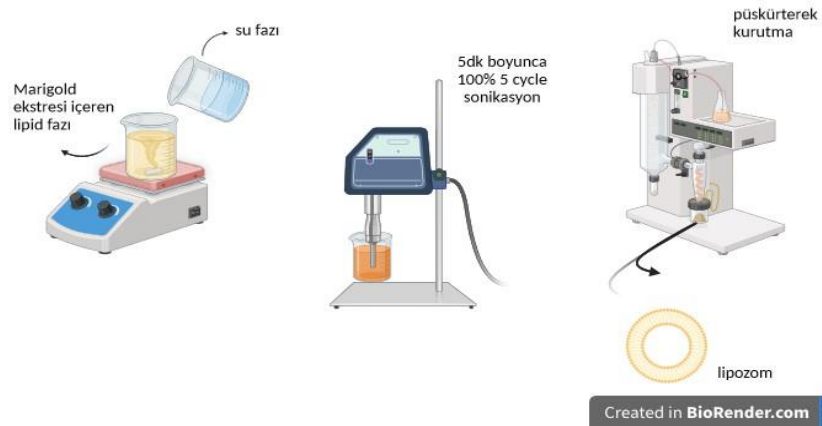
Tablo 8. Beşinci Formülasyon Denemesi

Lipoid S100	%0,1
Kolestrol	%0,025
Laktoz	%5
Etanol:su (2:98)	100mL
Marigold Ekstresi	%0,04

Final Formülasyonların Hazırlanması

Yöntemin ilerleyen bölümlerinde anlatıldığı gibi etkenlik çalışmaları yapılmış ve bu doğrultuda marigold ekstresinin hücrelerdeki etkisinin optimum olduğu miktarlar tayin edilmiştir. Bu kapsamda bulunan sırasıyla 5, 2.5, 1 µg/ml etken madde içeren formülasyonlar hazırlanmıştır.

Lipoid S100 ve kolesterol 30mL etanol ile 70°C sıcaklık verilerek manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmaya başlatılmıştır üzerine belirlenen marigold ekstresi üç farklı konsantrasyon da eklenmiştir. Diğer bir beher de ise 20mL suyun içinde toplam katı maddenin %0.05 kadar koruyucu olarak BHT çözünmeye bırakılmıştır. Çözünen bu karışımın üzerine laktoz eklenerek iki beher manyetik karıştırıcı yardımı ile tek bir beherde toplanmıştır. Formülasyonlar püskürterek kurutma cihazına verilmeden önce 5 dakika boyunca sonikatörden (5dk.5cycle.100% güç) geçirilmişlerdir (Hussein, 2019).



Şekil 4. Formülasyon Hazırlama Prosesi

2.2.3. Formülasyonların Karakterizasyonu

2.2.3.1. Formülasyonların Morfolojik Özellikleri

Marigold ekstresi içeren formülasyonlarının şekil ve yapı özelliklerinin incelenmesi amacıyla Bölüm 2.2.2.2’de bahsedilen final formülasyonları TEM ile görüntülenmiştir. 10 µL NLT dispersiyonu, 400 mesh karbon film kaplı bakır ızgara üzerine damlatılarak, 24 saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Izgaralar daha sonra geçirimli elektron mikroskopunda (FEI Tecnai G2 Series), 80 kV’de görüntülenmiştir.

2.2.3.2. Formülasyonların Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (DSC) ile Yapılan Analizleri

Marigold ekstresi içeren F6, F7, F8 formülasyonlarının fizikokimyasal özellikleri Perkin Elmer DSC6000 cihazı kullanılarak 25-300°C aralığında tayin edilmiştir.

2.2.3.3. Formülasyonların FT-IR Spektrum Analizleri

Marigold ekstresi içeren F6, F7, F8 formülasyonları için 400 cm⁻¹ dalga boyundan-4000 cm⁻¹ dalga boyuna kadar, 25°C oda sıcaklığında Fourier Transform Infrared (FT-IR) spektrum analizi yapıldı.

2.2.3.4. Formülasyonların Zeta Potansiyel, Partikül boyutu ve Polidispers İndisi Analizleri

Formülasyon çalışmaları doğrultusunda hazırlanan F6, F7, F8 formülasyonlarının partikül boyutu ve polidispersite indeksi Malvern NanoZS4700 nanoserisi zetasizer cihazı yardımı ile belirlendi. Malvern zetasizer, parçacık boyutunda nanometrenin altından milimetreye kadar her türlü parçacık boyutu analizi ve karakterizasyonu için, hem ıslak hem de kuru numuneler için partikül boyutu ölçümünü kapsayan uygulama gereksinimleri karşılamak üzere çeşitli partikül boyutu analizörleri sunar. Parçacık boyutu analizörleri farklı ölçüm prensipleri kullanarak 0,3 nm'den >3 mm'ye kadar bir boyut aralığını kapsarlar. Bu sistem dünya çapında tüm endüstrilerde hem ürün geliştirme, üretim ve kalite kontrol hem de Ar-Ge amacıyla kullanılmaktadır.

Partikül boyutu ölçümü öncesinde formülasyonlardan 6 mg alınıp 1mL su ile seyreltilmiştir. Süspansiyon hale getirilen lipozomların ışık saçılımı yöntemi ile partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımı belirlenmiştir ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür.

2.2.4. Formülasyonların Aktivite Çalışmaları

2.4.1. Mavi Işık Yayan Düzenek Tasarlanması

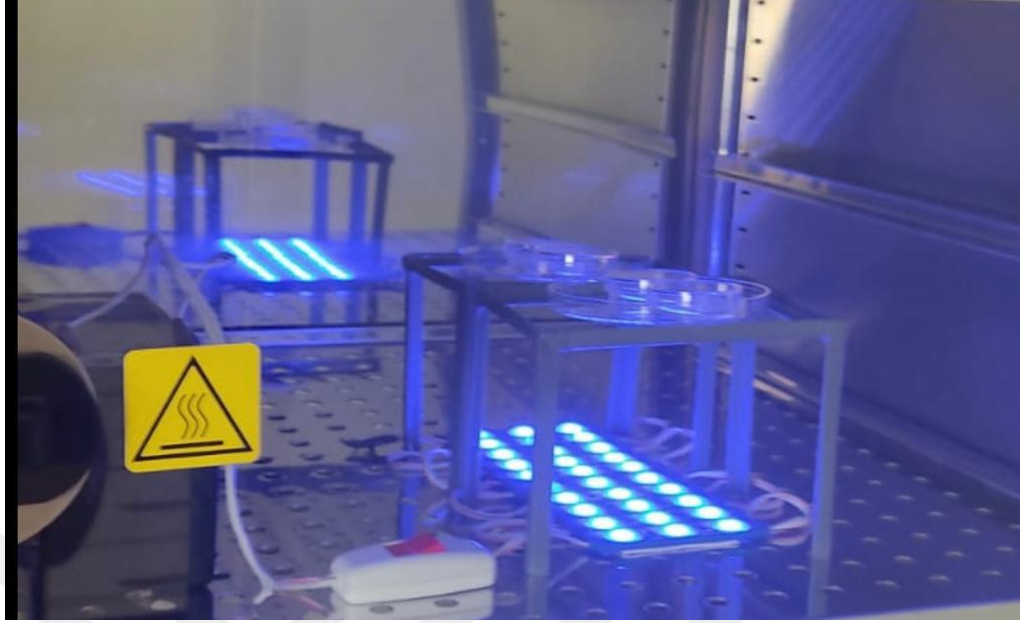
Etkenlik çalışmaları doğrultusunda marigold ekstresi içeren lipozomlar ile çalışmalar yürütülmüştür. Bu kapsamda Hekn ve HDFa hücreleri mavi ışığa maruz bırakabilmek için inkübatör içinde çalışabilen mavi ışık düzeneği tasarlanmıştır.

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda hücre hasarına neden olacak enerji miktarı hesaplanmış ve kaç led lamba ile bu enerjinin açığa çıkabileceği Ege Üniversitesi Elektirik ve Elektronik Mühendisliği bölüm hocası Doç.Dr Yavuz ÖZTÜRK tarafından hesaplanmıştır. Ayrıca bu enerjinin hücrelere ulaşması için gerekli mesafe de belirlenmiş ve hücrelerin olacağı well plateleri taşıyabilecek belirli yüksekliğe sahip tablalar sanayide hazırlanmıştır. Sonuçta tüm düzeneğin yaydığı enerji miktarı yine Doç.Dr Yavuz ÖZTÜRK tarafından ölçülmüştür (Ogawa et al., 2014).

Bunun için 3 sıra ve her sırada 10 adet bulunan 82x18 mm mavi ledler kullanılmıştır. Mercekli modül ledler alüminyum Pcb (printed circuit board) üzerine dizilmiştir. Alüminyum Pcb soğutucu görevi görmüş ve ledlerin ısınmasını engellemiştir.

1.5w mercekli modül ledlerden toplam 150w enerji açığa çıkmaktadır. Bu düzeneğin inkübatörde çalışabilmesi için şarj edilebilir 12 v bir akü kullanılmıştır.

İstenilen 446 nm dalga boyunu sağlayabilmek için hücrelerin tamamının belli bir mesafeden ışığa maruz bırakılması gerekmektedir. Bunun için OMM-6810B - ILX Lightwave Optical Power Meters 1000 mW, 350 to 1700 nm kullanılmıştır. Bu ölçüm sonucunda 15 cm mesafenin ideal mesafe olduğu karar verilmiştir. Yaptırılan 15 cm'lik metal düzeneğin üzerinden hücrelere deney boyunca ışın verilmiştir.



Şekil 5. Mavi Işık Yayan Düzenek

2.2.4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.2.4.2.1. Etken Maddenin Uygun Dozun Belirlenmesi

Etkinlik açısından optimize miktarda marigold ekstresi içeren formülasyonların hazırlanması için marigold ekstresi artan konsantrasyonlarda HEKn hücreleri üzerinde denenmiştir ve mavi ışığa maruz bırakılmıştır. Bu denemeler de mavi ışığın gerek hücre canlılığı üzerinde olan etkisi gerekse ROS oluşumu üzerine olan etkisi açısından değerlendirilmiştir ve en iyi kontrol seviyesine geri dönüşü sağlayan konsantrasyonlar seçilmiştir.

2.2.4.2.2 Mavi Işığın Hücreler Üzerindeki Etkenliği

Mavi Işığın HEKn hücrelerindeki ROS oluşumu üzerindeki etkileri farklı zaman aralıklarında değerlendirilmiştir. 1, 4, 8 ve 24 saatlik mavi ışık uygulamalarının ROS oluşumu üzerine olan etkileri florojenik bir substrat olan 2,7-Diklorodihidrofloreskein diasetat ile değerlendirilmiştir. Deneysel inkübasyon sürelerinin tamamlanmasından sonra, final konsantrasyonu 10 μ M olacak şekilde boya içeren PBS (loading buffer) hücrelere eklenmiş ve 37°C’de ve 30 dk süresince inkübe edilmiştir. Ardından hücreler toplanmış ve santrifüjlendikten sonra 1x konsantrasyon PBS’de homojenize edilmiştir.

ROS ölçümü için uygun olan siyah platelere eşit hacimlerde dağıtıldıktan sonra, oksidasyon ürünlerinin absorpsiyon ve emisyonları sırası ile; 493 ve 520 nm’de ölçülmüştür. Kalan pelletlerde ise protein izolasyonu yapılarak ve örneklerdeki protein miktarı BCA assay ile belirlenmiştir. Elde edilen ROS değerleri; örneklerdeki protein miktarları ile normalize edilerek sunulmuştur.

2.2.4.2.3 Mavi Işığın Uygun Zaman Aralığının Saptanması

Mavi ışığın uygun zaman değerinin saptanabilmesi için farklı saatlerde HEKn hücrelerine tasarlanmış olan düzenek yardımı ile mavi ışık uygulamaları yapılmıştır. Bu uygulama sonrası hücrelerde ROS oluşumu değerlendirilmiştir. Mavi ışığa 4, 8 ve 24 saatlik maruz bırakılan HEKn hücreleri kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Yapılan bu değerlendirmeler sonucu ideal maruz bırakılma aralığı saptanmıştır

2.2.4.2.4. HEKn Hücre Çalışmaları

Optimize edilmiş 3 formülasyon için iki farklı hücre hattı kullanılmıştır. İlk hücre hattı HEKn (İnsan Primer Epidermal Keratinosit, ATCC; PCS-200-010) hücreleri. Bu hücreler kültüre için Dermal cell basal (ATCC; PCS-200-030) ortamına Tablo 9’da verilen ortam bileşenleri eklenmiş ve hücreler, bu besi ortamında 37°C’de %5 CO₂’li ortamda çoğaltılmıştır.

Tablo 9. Keratonosit Büyüme Kiti ve İçerikleri (ATCC; PCS-200-040)

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Bovine Pituitary Extract (BPE)	2 mL	%0,4
Rh-TGF- α	0.5 mL	0.5 ng/mL
l-Glutamine	15 mL	6 mM
Hyrocortisone Hemisuccinate	0.5 mL	100 ng/mL
Epinephrine	0.5 mL	1 mM
Rh Insulin	0.5 mL	5 mg/mL
Apo-Transferrin	0.5 mL	1 mM

2.2.4.2.5. HDFa Hücre Çalışmaları

Bir diğer hücre hattımız olan HDFa (İnsan primer dermal fibroblast, ATCC; PCS-201-012) hücreleri kültürü için ‘Human Fibroblast Expansion Basal’ ortamına (Gibco; M106500) ortamına ‘Low Serum Growth Supplement’i (Gibco; S00310) eklenerek kültüre edilmiş ve 37°C’de %5 CO₂’li ortamda çoğaltılmıştır.

2.2.5. Formülasyonların Stabilité Çalışmaları

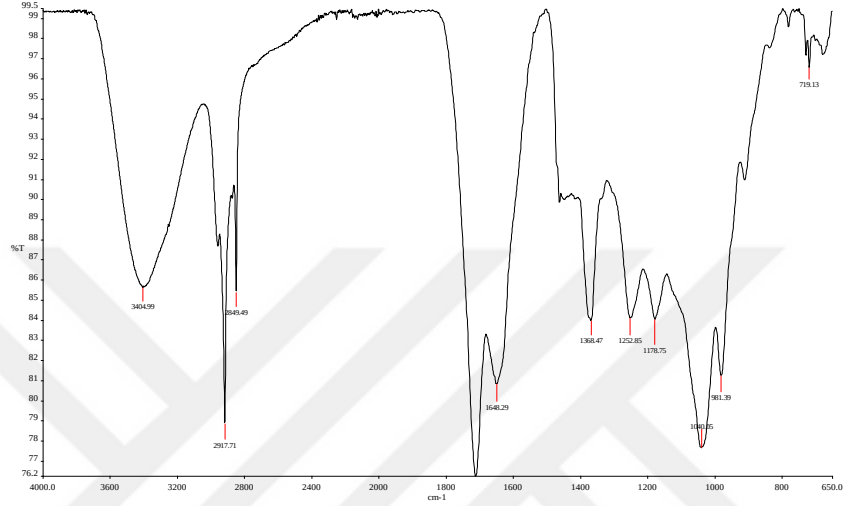
Stabilite çalışmaları, 3 ay süre ile 4°C buzdolabında, 25±5°C’de %60 relatif nem koşulları ve 40±5°C’de %75 relatif nem koşulları altında stabilite kabini kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Lipozomlar alüminyum folyo ile sarılı ependorflar içinde stabilite kabininde bekletilmektedir. Numuneler zeta potansiyel, polidispers indisi, partikül boyutu ve morfolojik özellikler açısından değerlendirilmektedir.

BULGULAR

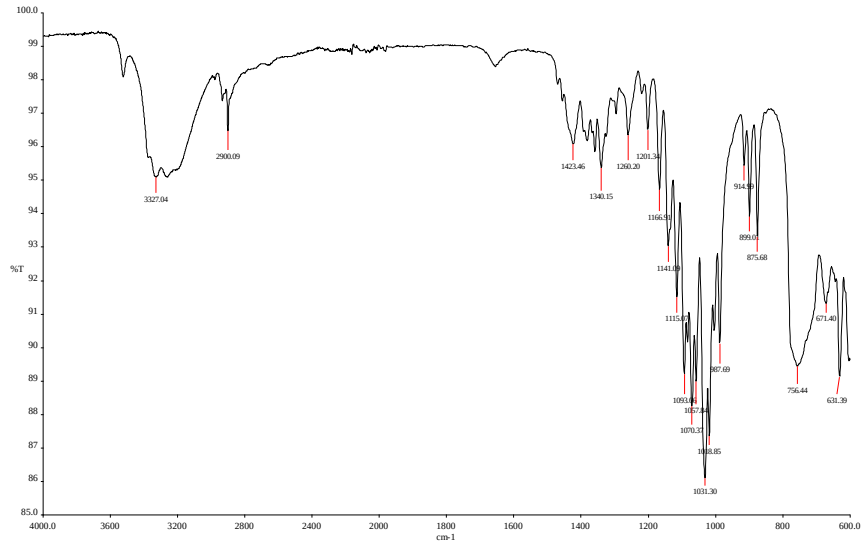
3.1. Etken Madde ve Yardımcı Maddelerin Fizikokimyasal Özellikleri

3.1.1. FT-IR Spektrumlarının İncelenmesi

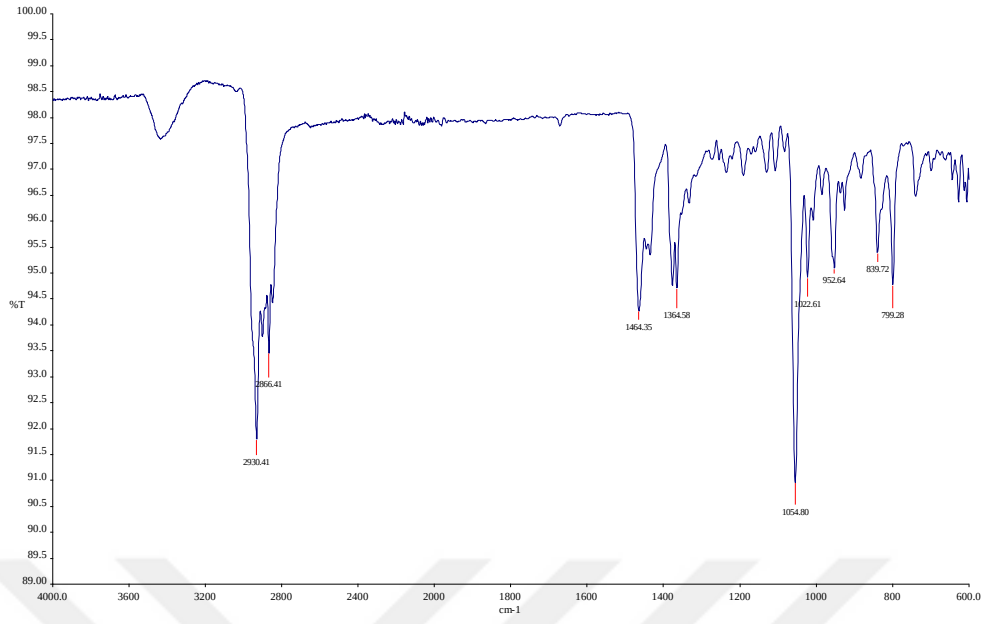
FT-IR çalışmaları yöntem 2.2.1.1’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen bulgulara ait sonuçlar Şekil 24 –27 ’de görülmektedir.



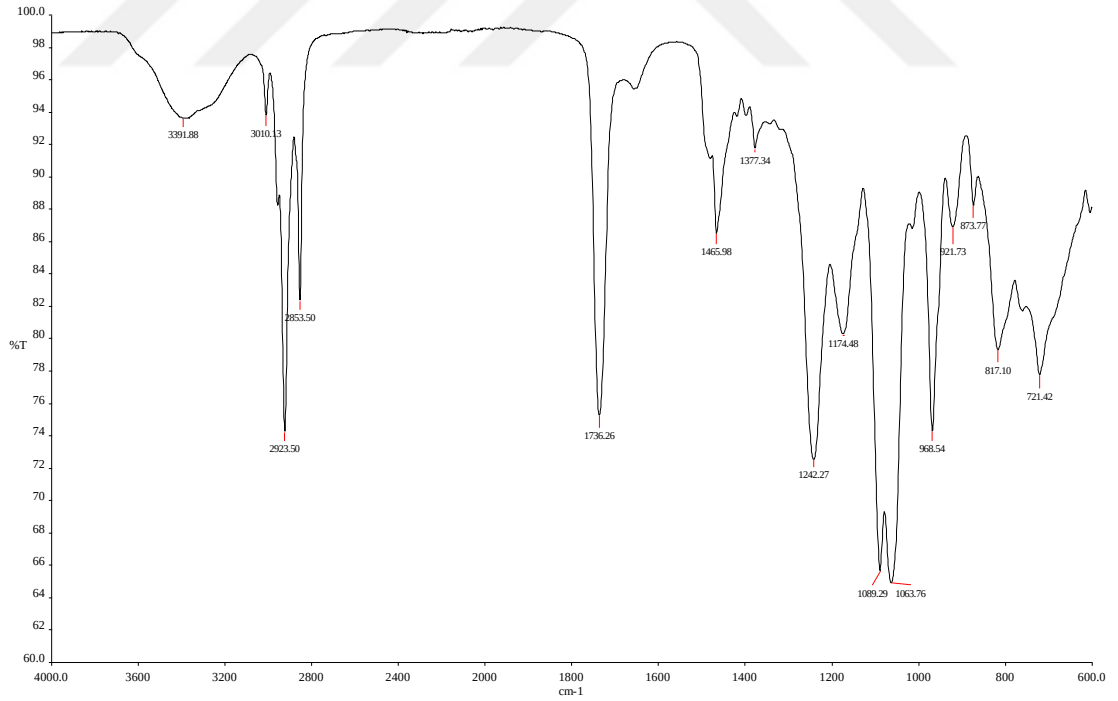
Şekil 6. Marigold Ekstresin’e ait FT-IR Spektrumu



Şekil 7. Laktöz’a ait FT-IR Spektrumu



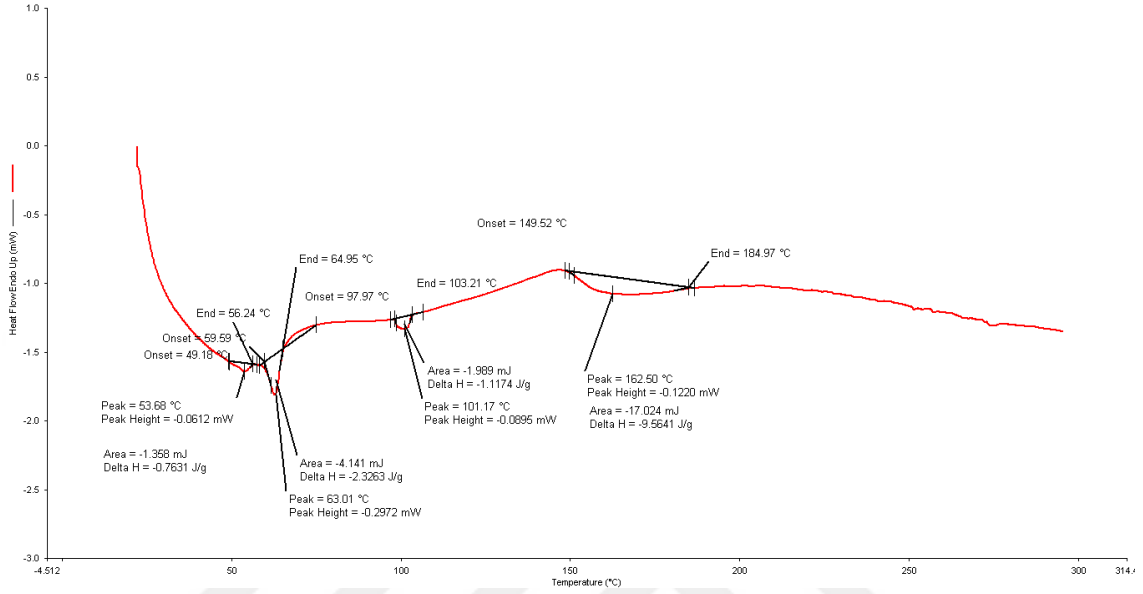
Şekil 8. Kolesterol'a ait FT-IR Spektrumu



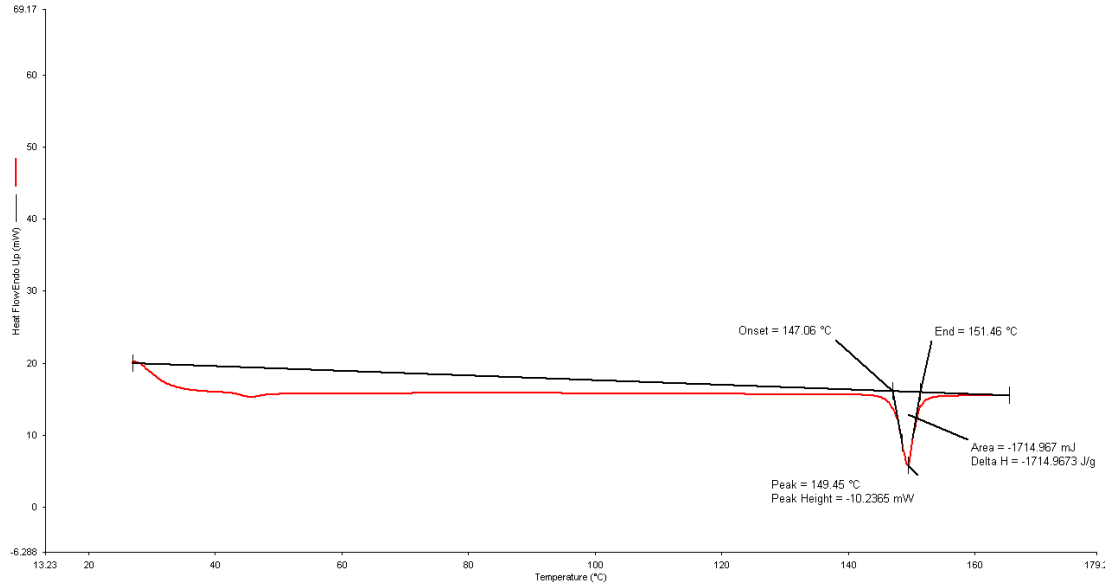
Şekil 9. Lipoid S100'a ait FT-IR Spektrumu

3.1.2. Diferansiyel Tarama Kalorimetresi ile Yapılan Çalışmalar

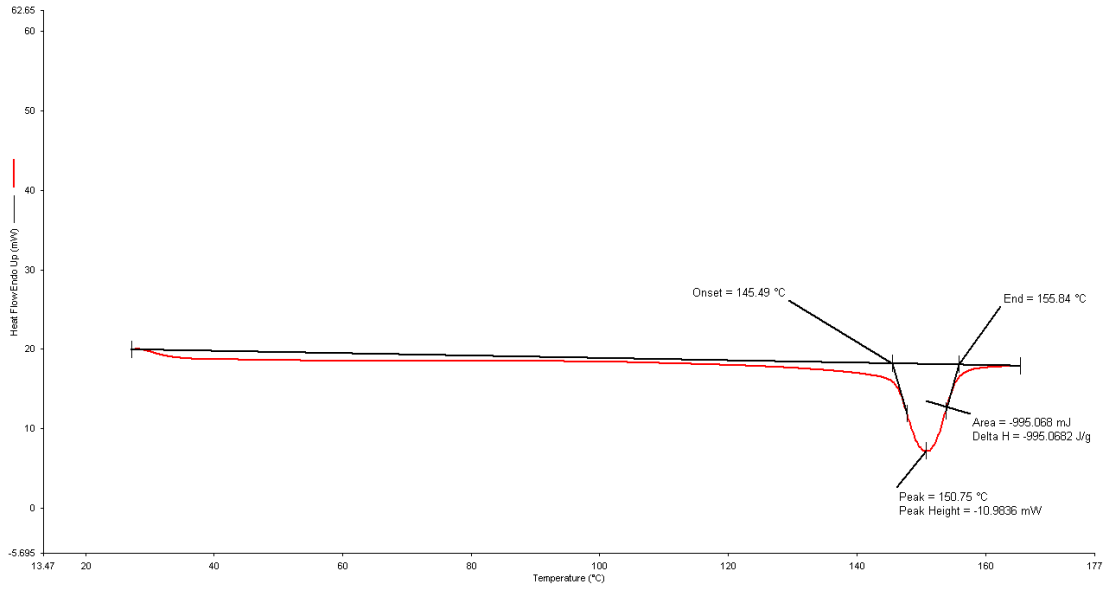
Marigol ekstresine ve yardımcı maddelere ait DSC çalışması yöntem: 2.2.1.2’de bahsedildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bulunan bulgular sonuç Şekil 26 – Şekil 28’de sunulmuştur.



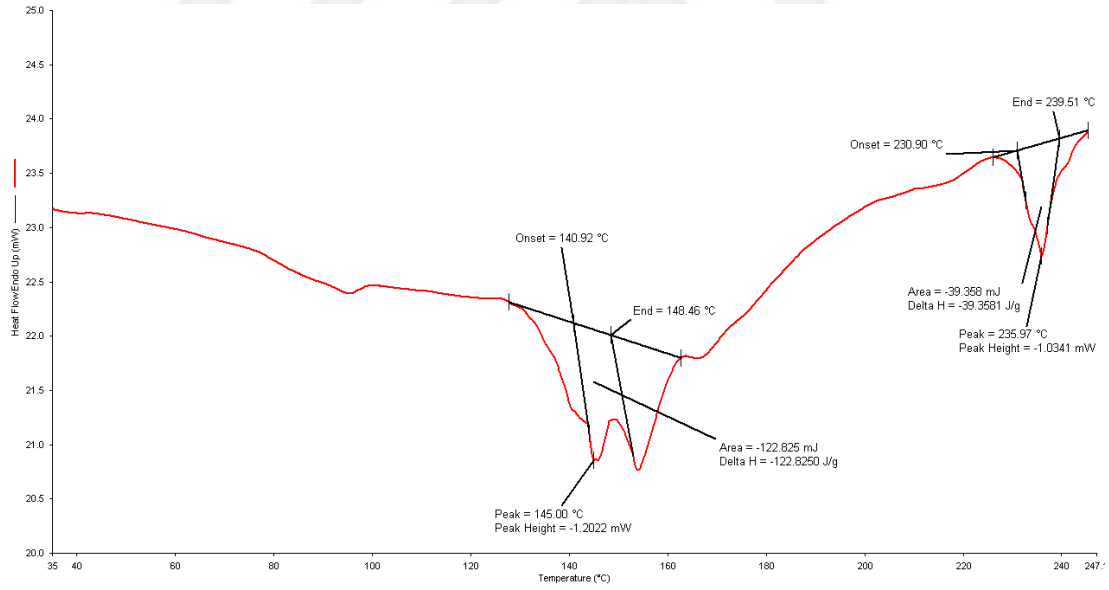
Şekil 10. Marigold Ekstresin’e ait DSC Spektrumu



Şekil 11. Kolesterol’e ait DSC Spektrumu



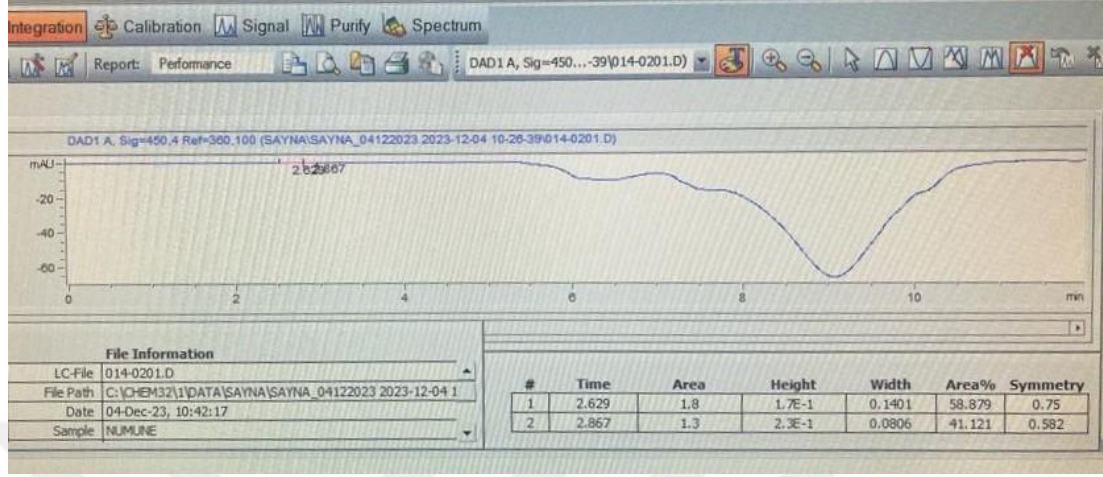
Şekil 12. Laktoza ait DSC Spektrumu



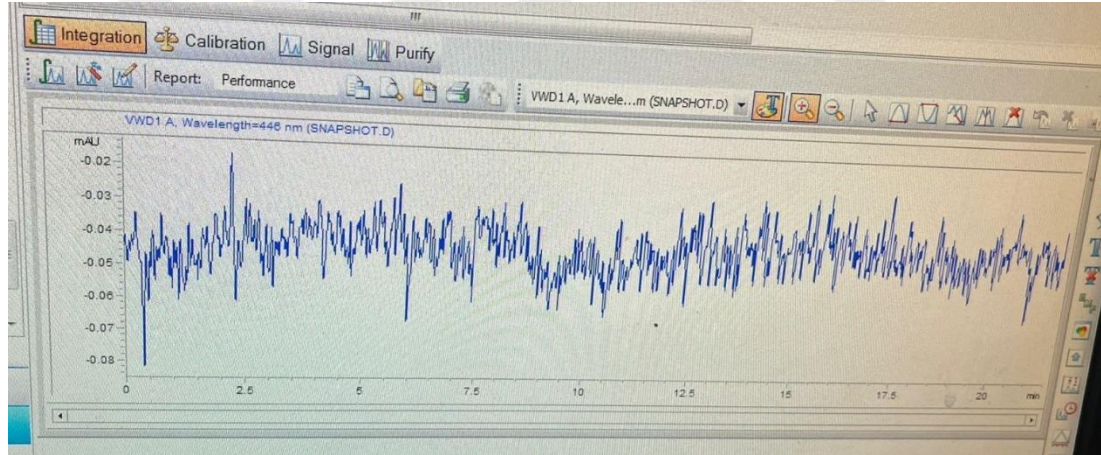
Şekil 13. Lipoid S 100 DSC Spektrumu

3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (YPSK) Yöntemi Bulguları

Yöntemler kısmında 2.2.1.3'te bahsedildiği gerçekleştirilmiş fakat marigold ekstresi için yapılan analitik yöntem geliştirme çalışmaları istenilen sonuçları vermemiştir.



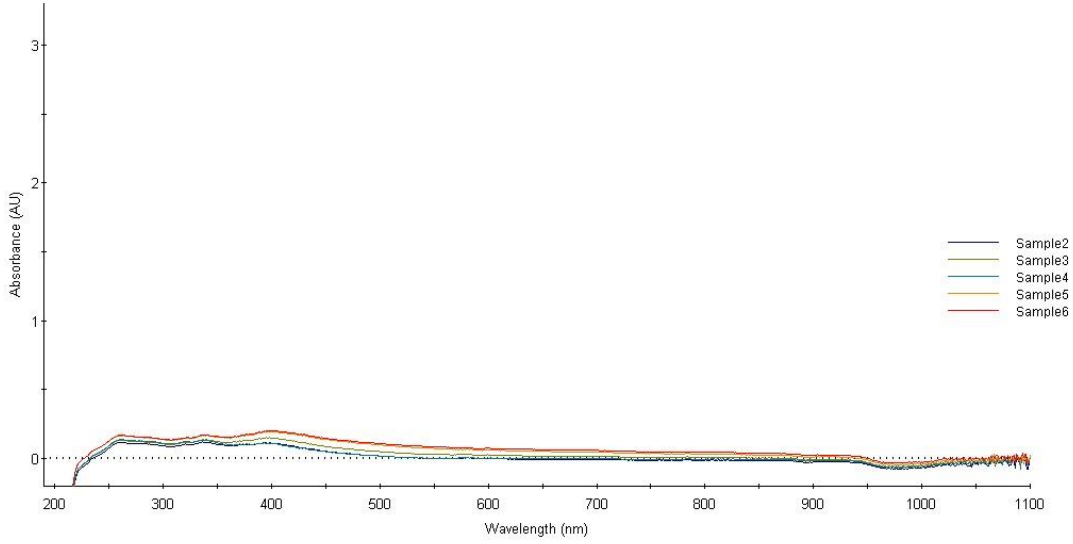
Şekil 14. Marigold ekstresinin Asetonitril: Metanol: Su: Etil Asetat (70:9,6:0,4:20) (h:h) içindeki YPSK Kromatogramı



Şekil 15. Marigold ekstresinin Hekzan: Etil Asetat (75:25) (h:h) içindeki YPSK Kromatogramı

3.1.4. Ultraviyole (UV) Spektrumuna ait Bulgular

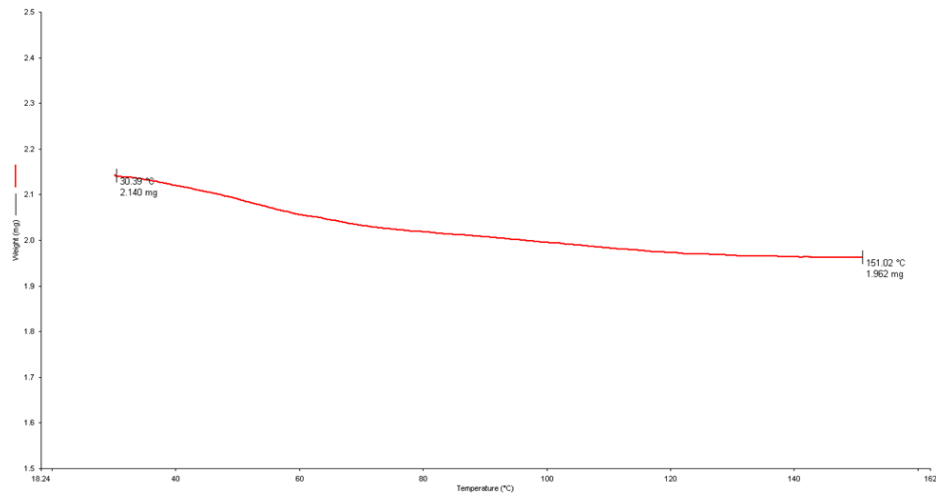
Yöntemler bölümünde 2.2.1.4'te anlatıldığı gibi marigold ekstresi UV spektrum ölçümü yapılmıştır. Beklenen 446 nm piki belirgin olmayan bir çıkıntı şeklinde gözlemlendi.



Şekil 16. Marigold Ekstresinin UV Spektrumu

3.1.5. Termogravimetrik analiz (TGA)

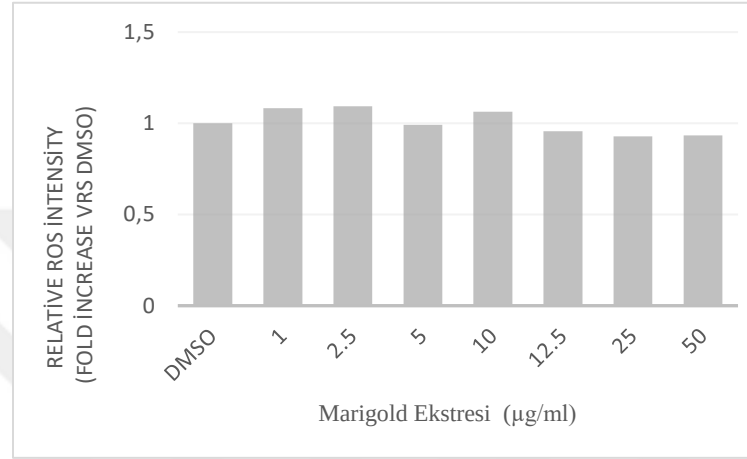
Yöntem: 2.2.1.5'te anlatıldığı üzere marigold ekstresini TGA sonucu Şekil 17'de gösterilmiştir. Numune (2.140 mg), analizden önce bir alüminyum pan üzerine yerleştirilmiştir. Numune 30-160°C sıcaklık aralığında 5°C/dakika hızla ısıtılmıştır. TGA termogramı yaklaşık 40°C'de başlayan kademeli bir ağırlık kaybını göstermiştir.



Şekil 17. Marigold ekstresine ait TGA grafiği

3.2. Formülasyon Geliştirme Çalışmaları

Formülasyonun etkenlik çalışmaları Bölüm 2.2.2’de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Formülasyon çalışmalarında marigold ekstresi’in artan konsantrasyonlarının ROS oluşumunu indüklediği, ancak hücre canlılığını azalttığı belirlendiği için formülasyon çalışmalarında düşük konsantrasyonlar olan 1, 2.5 ve 5 µg/ml marigold ekstresi içeren formülasyonlar hazırlanmıştır.



Şekil 18. Marigol Ekstresi Konsantrasyonun ROS Üzerindeki Etkisi

3.2.1. Püskürterek Kurutma Yöntemine ait Optimizasyon

Yöntem optimizasyonu için farklı pompalama hızları denenmiştir. Optimize edilmiş parametreler ise kurutma işlemi sırasında giriş sıcaklığı 120°C'ye, aspiratör hızı %100'e, besleme pompası hızı 12mL/dk ve 75-85°C arasında değişen bir çıkış sıcaklığı olarak belirlenmiştir.

3.2.2. Formülasyonların Optimizasyonu

Yöntemler bölümünde 2.2.2.2'te anlatıldığı gibi etkenlik çalışmaları doğrultusunda marigold ekstresinin hücrelerdeki etkisinin optimum olduğu 5, 2.5, 1 µg/ml etken madde içeren formülasyonlar hazırlanmıştır.

Stres stabilite çalışmaları sonucunda formülasyonlarda renk değişimi gözlemlenmiştir. Bu nedenle formülasyonlardaki oksidasyonu azaltmak amacıyla ortama antioksidan madde olarak BHT ilave edilmiştir.

BHT, dermal olarak uygulanan veya püskürtülebilen kozmetik ürün türlerinin geniş yelpazesinde antioksidan olarak %0,0002 ila %0,8 arasında kullanılmaktadır (SCCS, n.d.).

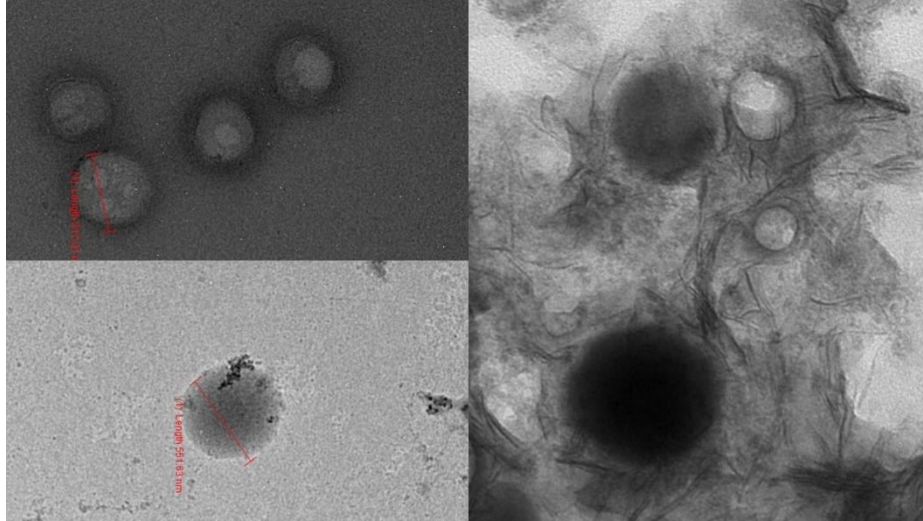
Tablo 10. Optimize Formülasyonlar

	F6	F7	F8
Lipoid S100	0.5g	0.25g	0.1g
Kolestrol	0.125 g	0.0625g	0.025g
Laktoz	0.2727 g	0.137g	0.0543g
Etanol:su (30:20)	50mL	50mL	50mL
Marigold ekstresi	0.285 g	0.144 g	0.056 g
BHT (%0.05)	0.0047g	0.0023g	0.0009g

3.3. Formülasyon Karakterizasyon Çalışmalarına ait Bulgular

3.3.1. Formülasyonların Morfolojik Özellikleri

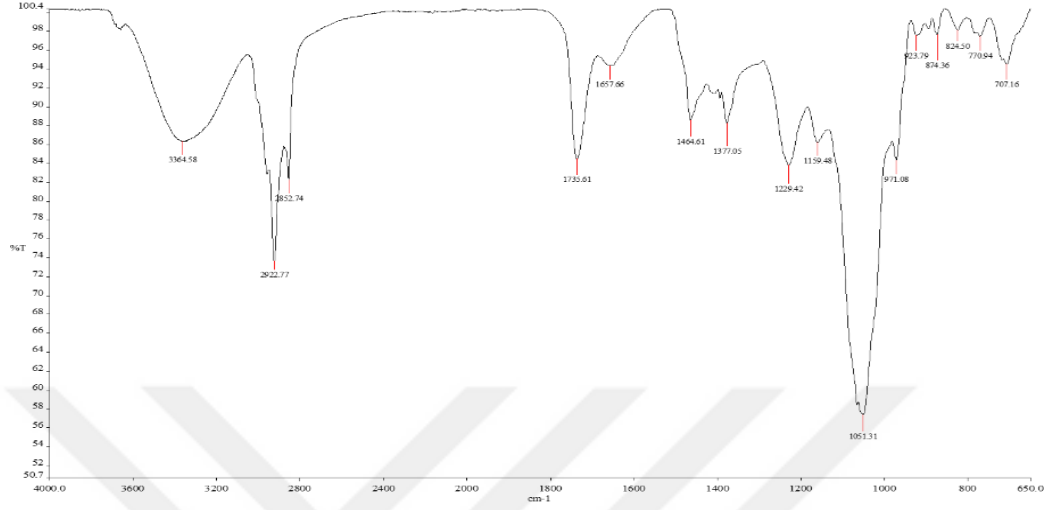
Yöntemler bölümünde 2.2.3.1’te anlatıldığı gibi optimize edilmiş final formülasyonlar için çekilmiş tem görüntüleri Şekil 19’de gösterilmiştir.



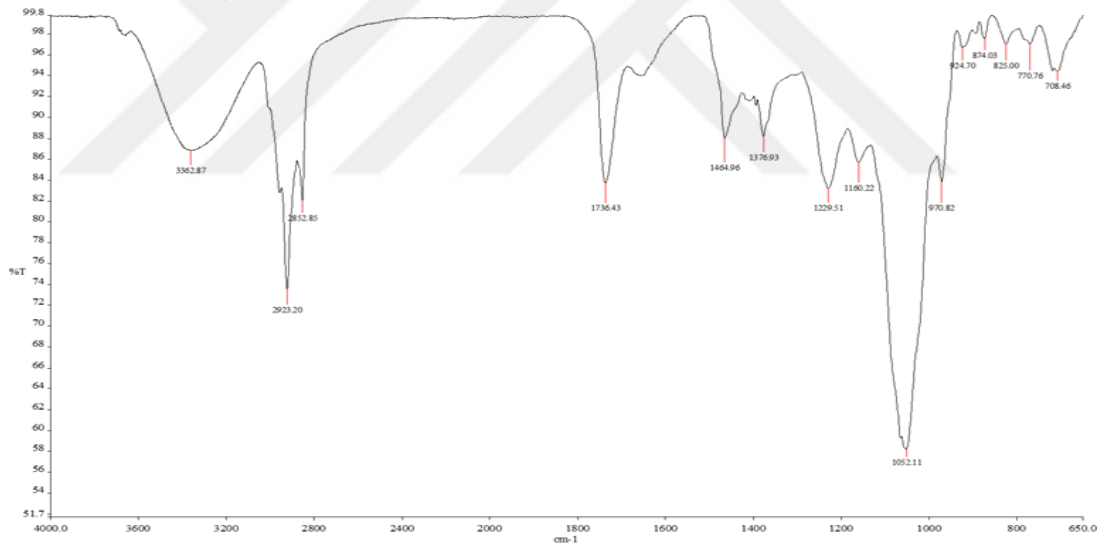
Şekil 19. Optimize Formülasyonlara ait TEM Görüntüleri

3.3.2. Formülasyonların FT-IR sonuçları

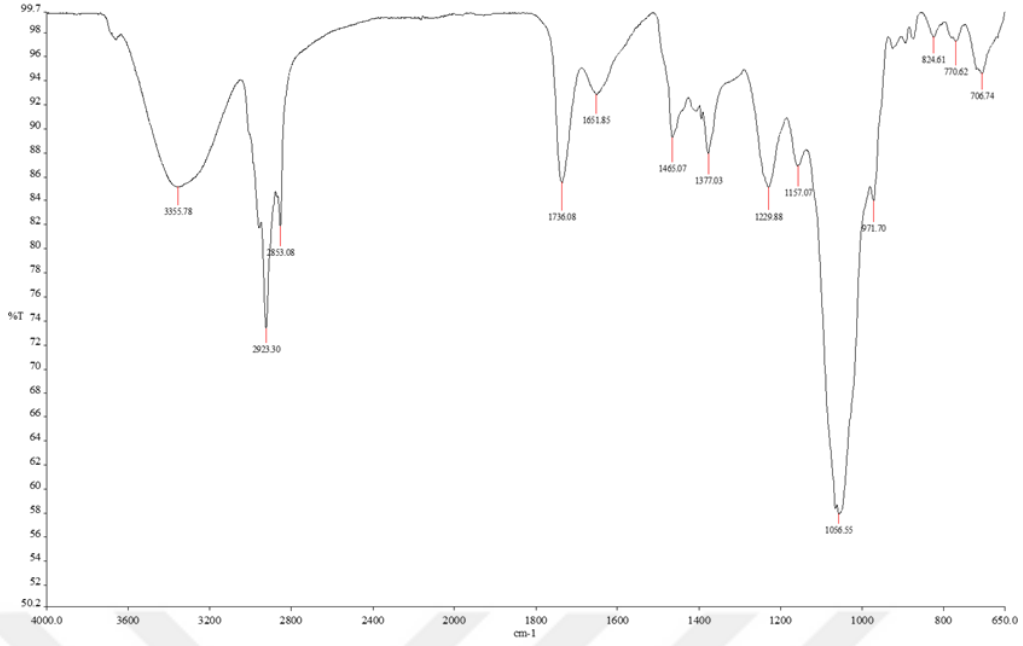
Yöntemler bölümünde 2.2.3.2’te anlatıldığı gibi F6, F7, F8 ait bulgular aşağıda sunulmuştur (Şekil 20-21-22).



Şekil 20. Optimize F6 Formülasyonuna ait FT-IR Grafiği



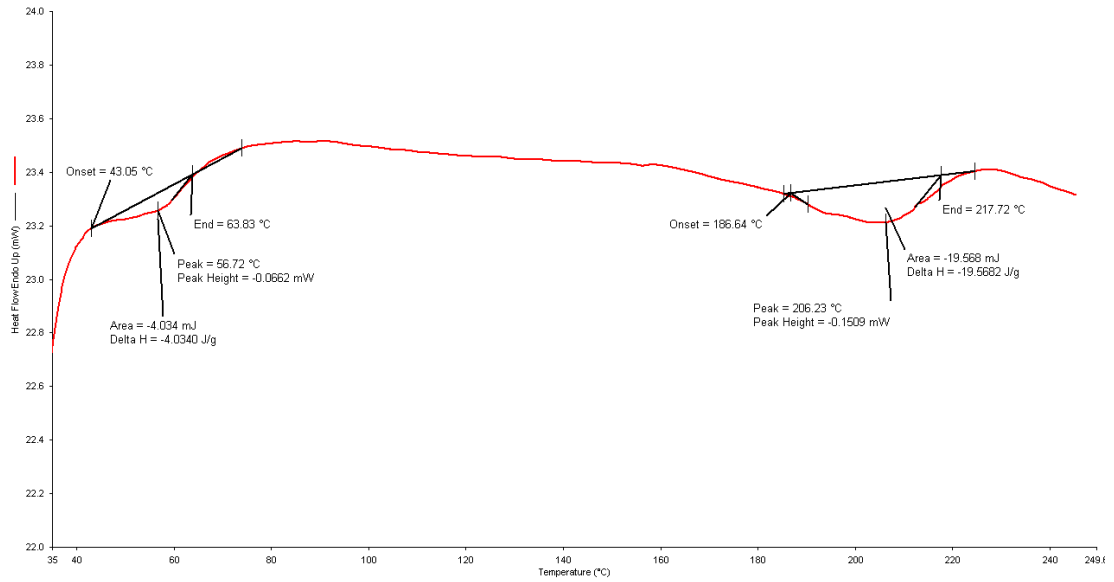
Şekil 21. Optimize F7 Formülasyonuna ait FT-IR Grafiği



Şekil 22. Optimize F8 Formülasyonuna ait FT-IR Grafiği

3.3.3. Formülasyonların DSC Sonuçları

Yöntemler bölümünde 2.2.3.3'te anlatıldığı gibi optimize edilmiş formülasyona ait DSC bulgusu aşağıda Şekil 23'de sunulmuştur.



Şekil 23. Optimize Formülasyonlara ait DSC Spektrumu

3.3.4. Formülasyonların Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Polidispersite İndisi

Yöntemler bölümünde 2.2.3.4'te anlatıldığı gibi tüm formülasyonlar için ölçüm yapılmıştır ve Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Tüm Formülasyonlara ait Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi

Formülasyonlar	Polidispersite İndeksi	Partikül Boyutu	Zeta Potansiyel
F1	0,76±0,13	264,1±23,8	-28,3±1,9
F2	0,37±0,008	183±1,3	-25±0,9
F3	0,38±0,019	119,1±0,55	-51,5±5,8
F4	0,506±0,09	189,6±6,92	-28,8±0,4
F5	0,66±0,036	197,7±0,83	-25,5±0,5
F6	0,813±0,036	1111±15,52	-19,7±1,01
F7	0,688±0,042	1418±41,58	-26,9±0,557
F8	0,806±0,09	1548±47,44	-31,6±0,115

3.4. Formülasyonların Aktivite Çalışmasına ait Bulgular

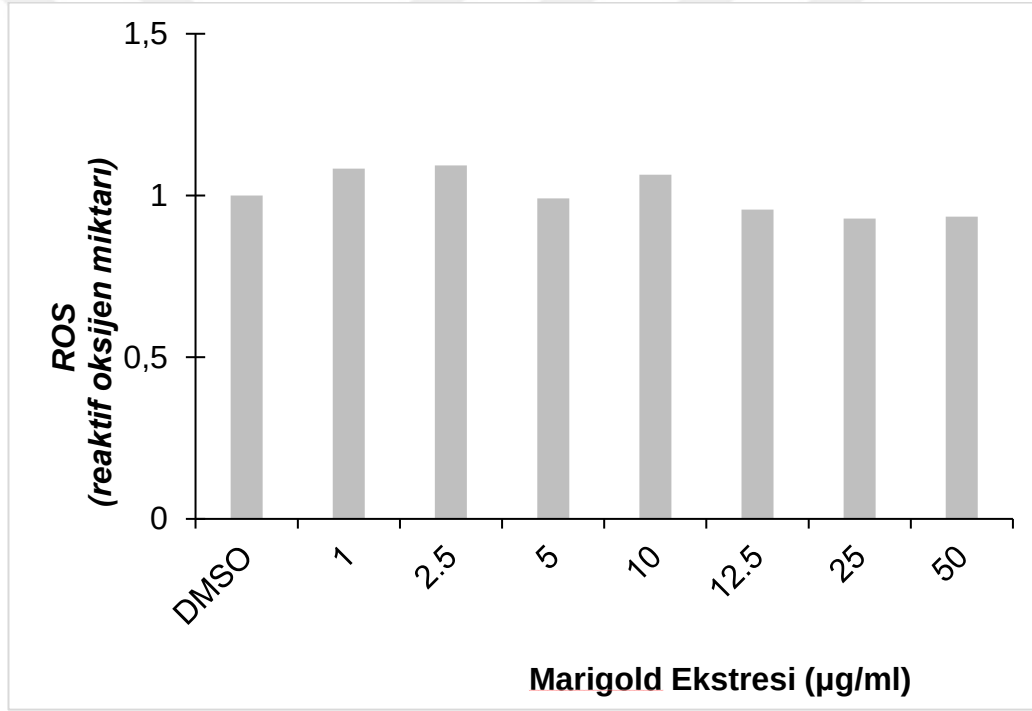
3.4.1. Hücre Kültürü Çalışması

Mavi ışık ile oluşturulan ROS türü oluşumunda formülasyonların etkilerinin değerlendirilebilmesi için florojenik bir substrat olan 2,7-Diklorodihidrofloreskein diasetat ile değerlendirilmiştir. Bu deneye öncesinde formülasyonun etken maddesi olan marigold ekstresinin hücre canlılığını negatif olarak etkilemediği konsantrasyonları ve aynı konsantrasyonların ROS seviyesi üzerine olan etkileri belirlenmiştir. Bu amaçla, ekstrenin artan konsantrasyonları (1, 2.5, 5, 10, 12.5, 25 ve 50 µM) HEKn hücrelerine 24 saatlik uygulamaları yapılmıştır. İnkübasyon sürelerinin tamamlanması ile ekstrenin artan konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine olan etkisi MTT ajanı (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) ile değerlendirmiştir. 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekilen HEKn hücrelerinin 24 saatlik marigold ekstresinin artan konsantrasyonlarında uygulamalarından sonra, kültür kapındaki ortam uzaklaştırılmış ve %10 MTT solüsyonu içeren besi ortamı (100 µL) eklenmiştir. MTT solüsyonu eklenen 96 kuyucuklu hücre kültür kapları 37°C'de %5 CO₂'li ortamda 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun tamamlanmasından sonra karanlık bir ortamda ortam uzaklaştırmış ve oluşan formazan kristallerini çözülebilir hale getirebilmek için kuyucuklara DMSO eklenmiştir. Kristallerin iyi bir şekilde çözülebilmesi için, 96

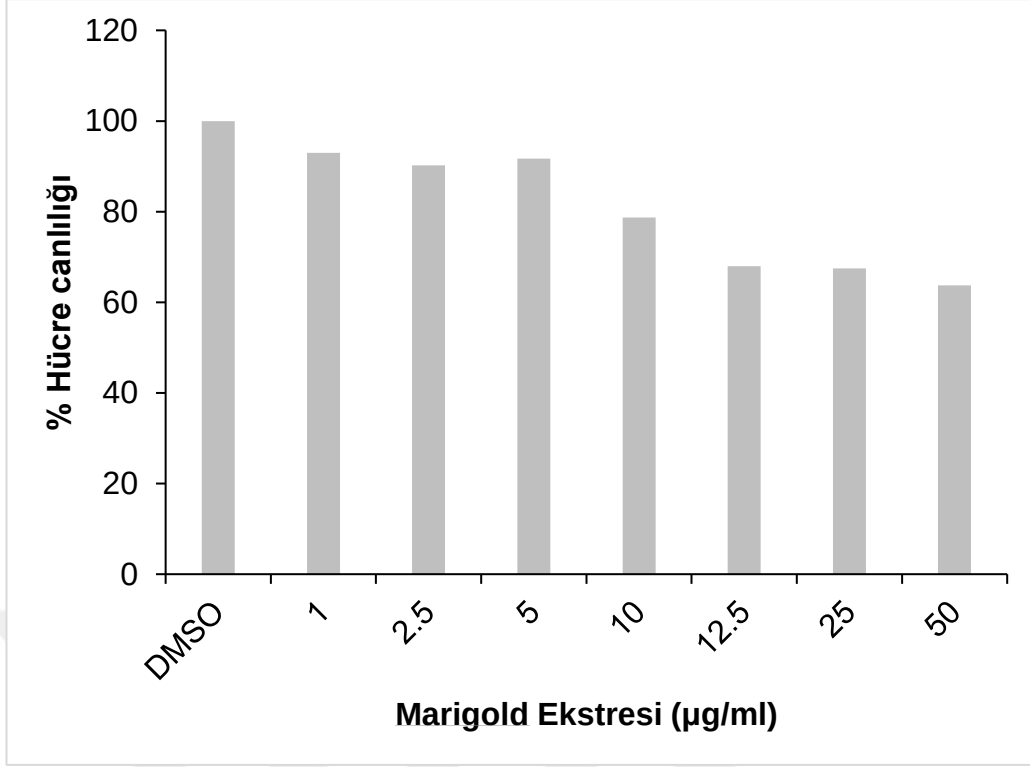
kuyucuklu kültür kapları, yatay çalkalayıcı üzerinde 15 dk boyunca bırakılmıştır. Kolorimetri ölçümleri mikroparka okuyucuda (Thermo Fisher Scientific) 570 nm’de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, test hücrelerinin absorbansı/kontrol hücrelerinin absorbansı olarak değerlendirilmiştir.

3.4.1.1. Etken Maddenin Uygun Dozunun Belirlenmesi

Yöntemler bölümünde 2.2.4.2.1’te anlatıldığı gibi marigold ekstresinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri ile ROS oluşumu üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Marigold ekstresinin artan konsantrasyonlarının ROS oluşumunu indüklediği, ancak hücre canlılığını azalttığı belirlendiği için formülasyon çalışmalarında düşük konsantrasyonlar olan 1, 2.5 ve 5 µg/ml olan konsantrasyonları optimum doz olarak seçilmiştir.



Şekil 24. Marigold Ekstresinin Artan Konsantrasyonlarının ROS Oluşumu Üzerindeki Etkisine ait Grafik



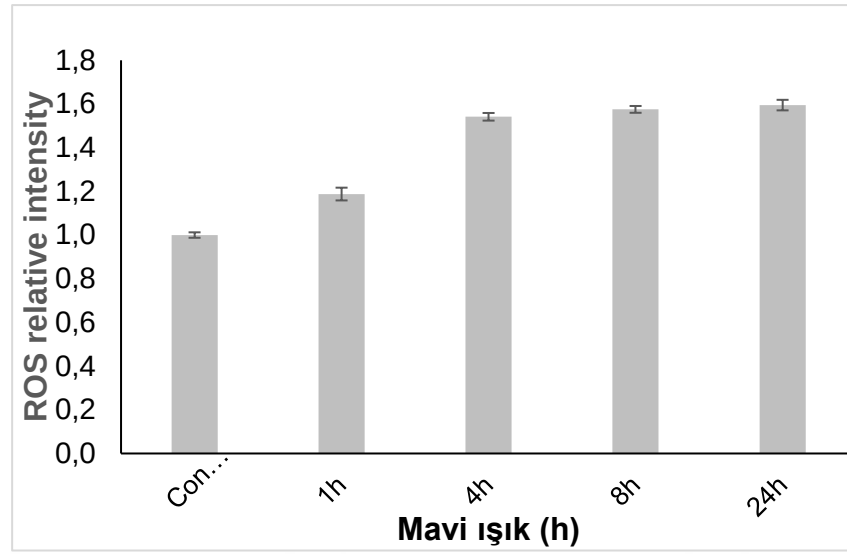
Şekil 25. Marigold Ekstresinin Artan Konsantrasyonlarının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisine ait Grafik

3.4.1.2. Mavi Işığın Hücre Üzerindeki Etkinlik Çalışmaları

Mavi ışığın HEK293 hücrelerindeki ROS oluşumu üzerindeki etkileri farklı zaman sürelerinde değerlendirilmiştir. Mavi ışığın ROS oluşumu üzerine olan etkileri florojenik bir substrat olan 2,7-Diklorodihidrofloreskein diasetat ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucu mavi ışığın hücrelerde ROS oluşturduğu belirlenmiştir.

3.4.1.3. Mavi Işığın Uygun Zaman Aralığının Saptanması

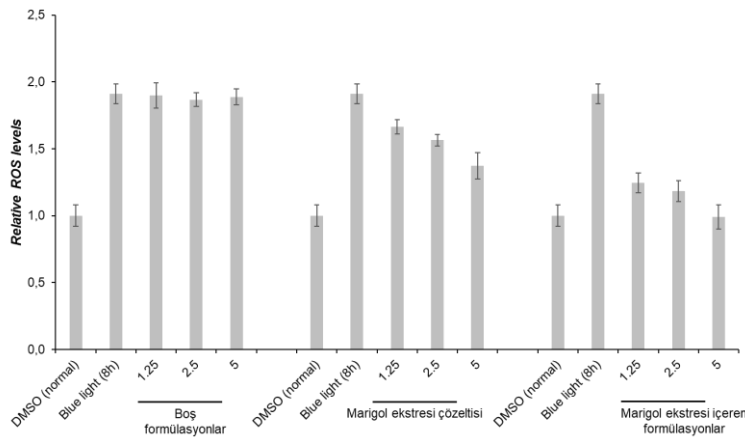
Mavi ışık için uygun zaman değerinin saptanabilmesi için farklı saatlerde HEK293 hücrelerine uygulamalarının yapılması sonrası ROS oluşumu değerlendirilmiştir. Mavi ışığa 4, 8 ve 24 saatlik maruz bırakılan HEK293 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine kıyasla sırası ile 1.54, 1.57 ve 1.59 kat ROS oluşumunun gerçekleştiği gösterilmiştir (Şekil 26). Formülasyonlar ile olan çalışma için optimum zaman değerinin 8 saat olmasına karar verilmiştir.



Şekil 26. Mavi Işığın Optimum Zaman Grafiği

3.4.1.4. HEkn Hücreleri ile Yapılan Çalışmalar

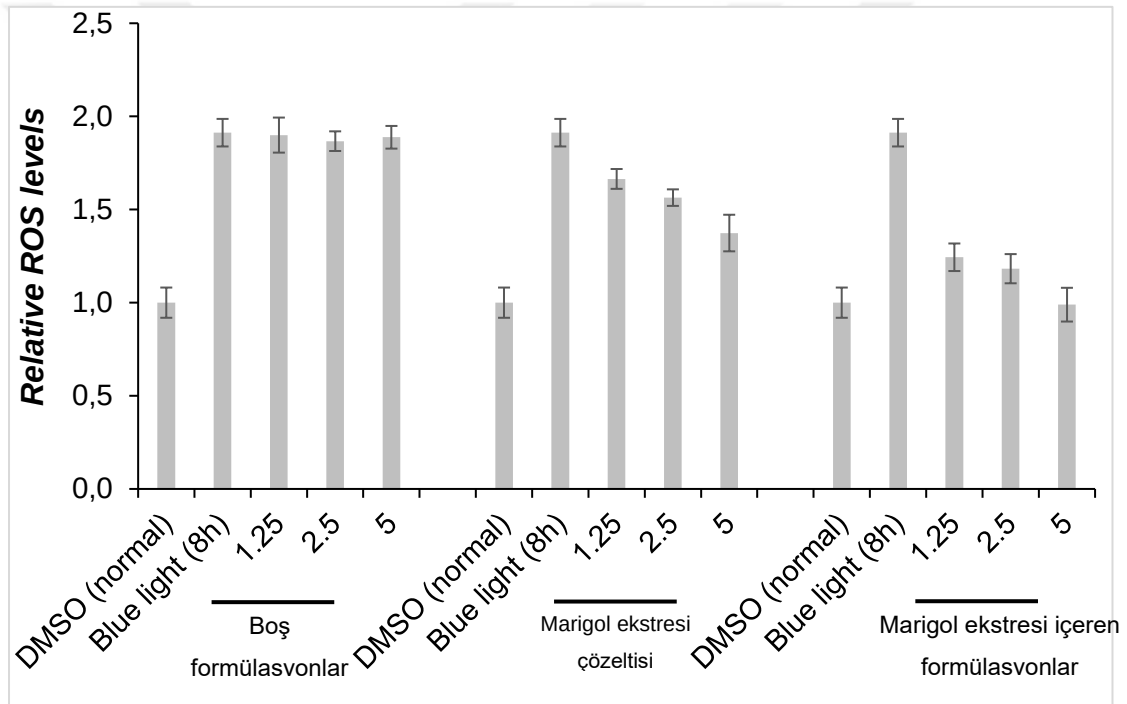
Marigold ekstresinin farklı konsantrasyonlarının mavi ışık ile oluşturulan ROS oluşumunu geriye çevirip çeviremediği bu çalışma kapsamında değerlendirilmiştir. Marigold ekstresi içeren çözelti, mavi ışık ile artan ROS seviyelerini (Kontrol grubu olan DMSO hücrelerine kıyasla 1.86 kat artarken) 1.25, 2.5 ve 5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda sırası ile 1.36, 1.29 ve 1.25 kata kadar azaltabildiği belirlenmiştir. Formülasyonda ekstrenin farklı konsantrasyonlarda uygulamalarının ise ROS seviyelerini 1.31, 1.27 ve 0.95 kata kadar azaltabildiği gösterilmiştir. 5 $\mu\text{g/mL}$ lutein içeren formülasyonun ROS seviyesini neredeyse kontrol seviyelerine indirmesi ve marigold ekstresi çözeltisine kıyasla artan ROS seviyelerini daha iyi geriye çevirebilmesi dikkat çekici bulunmuştur.



Şekil 27. HEkn Hücre Çalışmalarına ait Grafik

3.4.1.5. HDFa Hücre ile Yapılan Çalışmalar

Marigold ekstresinin farklı konsantrasyonlarının mavi ışık ile oluşturulan ROS oluşumunu geriye çevirip çeviremediği HDFa hücrelerinde de araştırılmıştır. Marigold ekstresinin çözeltisi, mavi ışık ile artan ROS seviyelerini (Kontrol grubu olan DMSO hücrelerine kıyasla 1.88 kat artarken) 1.25, 2.5 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda sırası ile 1.66, 1.56 ve 1.37 kata kadar azaltabildiği belirlenmiştir. Formülasyonda marigold ekstresinin farklı konsantrasyonlarda uygulamalarının ise ROS seviyelerini 1.24, 1.18 ve 0.98 kata kadar azaltabildiği gösterilmiştir. 5 µg/mL ekstre içeren formülasyonun ROS seviyesini neredeyse kontrol seviyelerine indirmesi ve ekstre çözeltisiyle kıyasla artan ROS seviyelerini daha iyi geriye çevirebilmesi dikkat çekici bulunmuştur.



Şekil 28. HDFa Hücre Çalışmalarına ait Grafik

3.5. Formülasyonların Stabilité Çalışmalarına ait Bulgular

Yöntemler bölümünde 2.2.5'te bahsedildiği gibi marigold ekstresinin optimum dozlarını içeren formülasyonlar stabilite kabine konulmuştur. Stabilitéye başlamadan önce her formülasyona ait zeta potansiyel, partikül boyutu ve polidispersite indeksi ölçümleri alınmıştır. Ölçüm sonuçları Tablo12'de ortalama değerleri ve standart sapmaları ile sunulmuştur. Önümüzdeki 3 ay boyunca her ay bu ölçümler tekrarlanarak stabilite çalışmaları devam edecektir. Ayrıca bu 3 ay boyunca formülasyonlardaki renk değişimi de kontrol edilecektir (Şekil 29).

Tablo 12. Stabilite Öncesine Ait Zeta Potansiyel, Partikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi Ölçümleri

F6 Formülasyonu	Polidispersite İndeksi	Partikül Boyutu	Zeta Potansiyel
Stabilite öncesi	0,494±0.122	1213±100,4	-31±0,907
1.ay stabilite buzdolabı	0,515±0,179	1282±30,61	-21,6± 0.9
1.ay stabilite 25°C	0,628±0.148	1295±58,2	-23,1± 0,624
1.ay stabilite 40°C	0,72±0,06	1309±40,05	-25,3± 0,814

F7 Formülasyonu	Polidispersite İndeksi	Partikül Boyutu	Zeta Potansiyel
Stabilite öncesi	0,533±0,272	1239±173,4	-30,25± 1,91
1.ay stabilite buzdolabı	0,711±0,069	1243±48,21	-31,5± 1,06
1.ay stabilite 25°C	0,753±0,035	1320±56,71	-34,7± 0,751
1.ay stabilite 40°C	0,802±0,068	1232±38,81	-25,9± 0,4

F8 Formülasyonu	Polidispersite İndeksi	Partikül Boyutu	Zeta Potansiyel
Stabilite öncesi	0,504±0,104	1552±265,6	-24,9±1,46
1.ay stabilite buzdolabı	0,469±0,198	1590±131,9	-30,4±0,458
1.ay stabilite 25°C	0,667±0,307	1683±31,47	-33,9±0,709
1.ay stabilite 40°C	0,764±0,179	1857±100,5	-28,5± 0,6



Şekil 29. Formülasyonlara Ait Birinci Ay Renk Durumu

TARTIŞMA

Günümüzde hayatımızın ayrılmaz bir parçası haline gelen bilgisayarlar, cep telefonları ve televizyonların aslında cilt sağlığımız üzerindeki negatif etkileri giderek belirginleşmeye başlamıştır. Bunların en başında gelen en çok maruziyet altında olan cildimiz yaşlanma belirtileri göstermesidir. Bu yaşlanma fotoyaşlanma olarak da bilinmektedir. Bu cihazların yaydığı mavi ışığın (400-700 nm arasındaki ışınlar) cildimizin en alt katmanını olan dermise kadar nüfuz ederek ROS yani reaktif oksijen türleri oluşumuna neden olmuştur. Oluşan ROS'ları geri döndürme sadece antioksidanlar yardımı ile mümkündür bu çalışma da marigold ekstresi kullanarak ROS seviyesini kontrol grubu seviyesine geri indirme hedeflenmiştir. Marigol ekstresinin ana bileşeni olan luteinin mavi ışığın göz retinası ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu (AMD), özellikle makula luteayı hedef alan bu hastalık üzerinde olan etkisi yayınlar ile saplanılmıştır(Roberts et al., 2009).

Bu ekstreyi seçmemizin nedeni lutein içermesi ve luteinin de güçlü bir antioksin etkisi olmasıdır. Antioksidanlar karasızlıkları nedeniyle kozmetik ürünlerde lipozomal sistemlerin içine yüklenerek formüle edilebilirler. Bu lipozomal formülasyonların stabilite ve yarılanma ömrünü uzatabilmek için farklı kurutma yöntemleri ile ortamdan su uzaklaştırılmaktadır. Bu çalışma kapsamında; püskürterek kuruma cihazı kullanarak lipozomlarda görülen stabilite problemini çözülmeye çalışılmıştır. Literatür araştırması sonucunda bulunan formülasyon hazırlama yöntemlerinden ilk aşmada gönderilen TEM görüntüleme sonuçlarının en iyi gözlemlendiği yöntem seçilmiştir. Etkin maddenin formülasyonlardaki uygun konsantrasyonunu belirlemek için hücre kültür çalışmaları kapsamında hücre hattı olan HEK293T hatları kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Bu hücre hatlarına eşit bir mesafeden 446 nm dalga boyunu verebilmek için öncelikle Lightwave Optical Power Meters cihazı kullanarak mavi ışık yayan sistemin hücreler ile olan mesafesi ayarlanmıştır. Bu led ışıkların inkübatör içinde çalışma koşullarına uygun hale getirmek için şarj edilebilir akü kullanılmıştır ve 15 cm mesafenin bizim için ideal olduğu yapılan UV enerji ölçümü ile saptanmıştır. Deney süresi belirlemek için; hücre hatlarının ne kadar bu mavi ışığa maruz bırakıldıklarında ROS oluşumu gerçekleştirdiği saptanmıştır ve bu zaman aralığı 8 saat olarak belirlenmiştir. 8 saat sonrası hücre canlılığının azalmaya başladığı belirlenmiş optimize zaman 8 saat olarak seçilmiştir. Belirtilmiş deney koşulları kapsamında hücrelere mavi ışık

verilemeye başlanmış ve artarak giden marigold ekstresi konsantrasyonları denenmeye başlanmıştır. Artan konsantrasyonların ROS oluşumunu indüklediği, ancak hücre canlılığını azalttığı belirlendiği için formülasyon çalışmalarında 1.25, 2.5 ve 5 µg/ml konsantrasyonlar belirlenen 3 optimum konsantrasyon olarak formülasyonlara ilave edilmiştir. Tez çalışması sürecinde optimize edilmiş formülasyonlar yöntem 2.2.2.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

Marigold ekstresi içeren formülasyon geliştirilmesi amacıyla çalışmalara başlarken ilk etapta etken maddenin ve formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Marigold ekstresine ait olan FT-IR spektrumu lutein maddesinin kimyasal yapısından dolayı ortaya çıkan karakteristik pikler, ekstrenin saflığı hakkında bilgi sağlamaktadır. Elde edilen pikler literatür çalışmaları ile uyumlu bulunup luteinin ana pikleri 3404.99, 2917.71, 2849.49, 1648.29, 1368.47, 1252.85, 1178.75, 1040.05, 981.39, ve 719.13 cm^{-1} dalga boylarında verdiği sonucuna ulaşılmıştır. 3404.99 ve 2917.71'teki tepe noktaları $\text{-C-H} / \text{=C-H}$ gerilme titreşimlerini temsil eder. 1648.29'deki bantlar ester gruplarının C = O gerilme titreşimine karşılık gelmiştir(Manzoor et al., 2022). Ayrıca lipoid S100, kolesterol ve laktoza ait FT-IR spektrum grafikleri incelendiğinde, luteine ait çekilen FT-IR spektrumu sonucunda kolesterol ve lipoid S100 ile lutein arasında olası bir etkileşme gözlenmediği görülmüştür (Şekil 6 -Şekil 9).

DSC cihazı kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda ise, öncelikli olarak marigold ekstresinin ve formülasyonda yer alan yardımcı maddelerin (lipoid S100, kolesterol, laktoz) DSC termogramları incelenmiş daha sonra ise hazırlanan marigold ekstresi içeren lipozomların termogramları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde etken madde ile yardımcı maddeler arasında herhangi bir etkileşim gözlemlenmemiştir (Şekil10-Şekil13). Lutein ve lipoid S100 bileşenlerinin fiziksel olarak karıştırılmasının, lutein kristallerinin ve lesitin agregatlarının bütünlüğü üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı, lipozomal birleşmenin ise moleküler düzenlemeyi önemli ölçüde değiştirebildiği ve oldukça farklı bir faz geçişi sağlayabildiği görülmektedir (Zhao et al., 2017).

Marigold ekstresine ait miktar tayini çalışmaları ve salım miktarının belirlenmesi amacıyla, YPSK kullanılarak, analitik yöntem geliştirilmeye çalışıldı. Bu çalışmalarda mobil faz olarak Asetonitril: Metanol: Su: Etil Asetat karışımı (70:9,6:0,4:20) (h:h) kullanılmış ve denemede YPSK kromatogramlarında negatif pikler gözlemlenmiştir.

Yapılan literatür incelemeleri sonucunda belirlenen farklı yöntemler denenmiş fakat istenilen sonuç hiçbir yöntemde elde edilememiştir(Ullah Bhuyian et al., n.d.). Zorbax RX-SIL (250 mm, 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılarak yapılan analizde, mobil faz olarak Hekzan: Etil Asetat karışımı (75:25) (h:h) kullanılmış ve oluşan gürültülü pikler doğru sonuç eldesini engellemiştir (Hadden et al., 1999). Sonuçta bu yöntem ile de başarılı olunamamıştır.

YPSK kullanılarak marigold ekstresinde mevcut olan lutein ve lutein standartı için analitik yöntem geliştirme çalışmaları henüz sonuçlanmamıştır. Farklı yöntem geliştirme çalışmaları proje kapsamında devam etmektedir.

YPKS ile başarılı sonuçlar elde edilememesinin ardından UV spektrofotometre kullanılarak toplam karatenoid tayini ile analiz yapılmaya çalışılmıştır. Analiz için 0.03g marigold ekstre, n-hexzan,eceton,methyl benzen,etanol (10:7:7:6) ile çözündürülerek 100ml'ye tamamlanmıştır.1ml alınarak 100ml'ye etanol ile tamamlanmıştır. 446 nm de UV spektrofotometrede pik gözlenmemiştir, ancak 300nm'de pik gözlemlenmiştir.

Diğer bir denemede ise 0.03g ekstre 100ml çözücü ile (1 kloroform:9 etanol) çözündürülmüş ve 445 nm'de UV spektrofotometrede okutulmuştur. Beklenen dalga boyunda herhangi bir pik gözlemlenmemiştir. UV spektrofotometresi kullanılarak toplam karatenoid üzerinden analitik yöntem geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Literatürlerde TGA cihazı ürünlerdeki nem miktarını tayin için kullanılmaktadır. Ekstreye ait TGA sonuçlarına göre sıcaklık artışı kütlede değişime sebep olmuştur. Bu kütle azalması %8.32 olarak belirlenmiştir ve ekstredeki nemden kaynaklı olduğu kabul edilmiştir(Al-Majed et al., 2018).

Marigold ekstresi yüklü lipozomal formülasyonlar bölüm 2.2.2.2'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır. Püskürterek kurutma yöntemi ile lipozomların stabilitesinin artırılması hedeflenmiştir. Sonuç ürün olarak toz halde lipozomal aktifin eldesi hem taşınma kolaylığı sağlayan hem de ekonomik bir seçenek olarak kabul edilmiştir. Formülasyonlarda lipid yapısını korumak için yapılan literatür araştırmaları sonucunda laktoz kullanılmıştır(Hussein, 2019). Lipoid S100 fosfolipiti özellikle topikal sistemlerde tercih edilen bir fosfolipittir. Kolesterol ise lipozomların stabilitesini arttırmak amacıyla formülasyona ilave edilmiştir.

Formülasyonlar ile ilk aşamada stres stabilite çalışması yürütülmüştür. Bu çalışmalar 50°C’de etüvlerde yürütülmüştür. Marigold ekstresinin yüksek oksidasyon kapasitesi nedeniyle renk değişimi görülmüştür. Bu nedenle formülasyonlara oksidasyona engel olabilecek bir bileşen olan bütül hidroksi tolüen kozmetiklerde kullanım miktarı olan %0.05 oranında ilave edilmiştir. Mevcut durumdaki stabilite çalışmaları oksidasyonun engellendiği yönündedir.

Bölüm2.2.2.2’de anlatılan 2 farklı yöntem püskürterek kurutma ile lipozomların eldesi için kullanılmıştır. Sonuçta yapılan TEM ile görüntüleme ile final formülasyonları bölümün ’de anlatılan yöntemin daha uygun olduğu görüldüğü için bu yöntem ile çalışmalara devam edilmiştir.

Hazırlanan formülasyonlar belirlenmiş parametreler açısından karakterize edilmiştir. İlk olarak formülasyonların TEM görüntülemeleri, 10 µL NLT dispersiyonu, 400 mesh karbon film kaplı bakır ızgara üzerine damlatılarak yapılmıştır. Bu görüntülemede lipozomların çift katmanlı görünümüne sahip ve veziküller yapıda olduğu gösterilmiştir.

Marigold ekstresi içeren F6, F7, F8 formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerini tayin için FT-IR ve DSC analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucu 3 formülasyon arasında anlamlı farklar gözlemlenmemiştir. Ancak FT-IR çalışmalarında marigold ekstresinde bulunun luteinin kimyasal yapısına ait 40-karbondan oluşan ve bu nedenle tetraterpenoidler olarak bilinen, metil yan gruplar ve alternatif tek ve çift karbon-karbon bağlarına rastlanmıştır.

Bu maddeye ait benzen halkalarının alifatik C-H titreşimlerine ait olan 3400 bandındaki pik her 3 formülasyonda gözlemlenmiştir. 2900-2800’ler arası gözlemlenen pikler ise metil gurubuna ait, karboksil gurubu C=O gurubu ise 1700’ler civarında pik vermiştir. Benzen halkasına ait C=C bağları 1400-1300 bandında görülmüş olup, lutein maddesine ait pikler olduğu düşünülmüştür. Lipoid S 100 ait amid gurubu C-N pikleri ise 1200-1100 aralığında belirlenmiştir. Sonuçta FT-IR analizi bileşimdeki maddelerin kimyasal stabilitesi göstermiştir.

Marigold ekstresinde bulunan lutein termogramı, 162°C’de bir endotermik tepe sergilemiştir. Final formülasyonlarında 162°C’de lutein sinyalinin yokluğu, lutein kristallerinin lipozomlara yüklendikten sonra daha küçük birimlere (monomerler, dimerler veya oligomerler) tamamen parçalanması nedeniyle lutein kristallerinin kaybını göstermiştir. Böylece luteinin orijinal spesifik kristal düzeni

bozulmuştur. Lutein katılımı ayrıca fosfolipidlerin orijinal paketlenmesine müdahale ederek çift katmanlı membranların akışkanlığını arttırmış ve böylece fosfolipitlerin faz geçiş sinyalini daha da genişletmiştir. Ek olarak, fosfolipidler ve lutein arasındaki orijinal düzenlemelerin, yeniden düzenlemenin ve etkileşimlerin bozulmasıyla birlikte, lipozomal çift katmanlar çoğunlukla gevşek bir şekilde paketlenmiş amorf bir durumda mevcuttur.

Formülasyonlar da 56.72°C'deki ilk endotermik zirve, fosfolipidlerin erimiş sıvı kristal aşamasına dönüşümünü temsil etmiş ve aynı zamanda emilen suyun dehidrasyonu da ilişkilendirilmiştir (Varma et al., 2021).

Zeta potansiyeli, dispersiyondaki bir parçacığın yüzey yükünü belirtmek açısından büyük önem taşır ve mutlak zeta potansiyel değeri $> \pm 30$ mV olan parçacıkların kararlı olduğu kabul edilmiştir (Hunter et al., 2001). Hazırlanan formülasyonlar toz formunda olup bir sisteme ilave edildiklerinde yükleri önem kazanacaktır. Bu nedenle liposomal tozların zeta potansiyel değeri saf su ile seyreltme sonrasında ölçülmüştür. Daha yüksek marigold ekstresi konsantrasyonuna sahip olan F6 içeriği, lipozomal yüzeydeki negatif yükü $-31 \pm 0,907$ mV olarak belirlenmiş, daha az konsantrasyona sahip F8 formülasyonda ise değer $-24,9 \pm 1,46$ mV olarak ölçülmüştür. Ekstre ilavesinin zeta potansiyeli düşürdüğü sonucuna varılmıştır. Soya lesitinindeki yüklü fosfolipit türlerinin varlığından kaynaklanan bu yüksek zeta potansiyeli değerleri, lipozomlar arasında büyük itici etkileşimlerin mevcut olduğunu ve bu etkileşimlerin veziküler agregasyonu önleyerek stabilitenin arttığını göstermiştir.

Öte yandan kapsüllenmiş lutein, esas olarak yağ açıl zincirindeki karbonil grubuyla ve biraz da fosfolipidlerin fosfat içeren hidrofilik baş bölgesiyle hidrojen bağı yoluyla bağlanmıştır (Róg & Pasenkiewicz-Gierula, 2006). Artan lutein katılımının, fosfolipid başları arasındaki boşluğu genişletmesi ve bunların sulu ortama daha fazla maruz kalmasına yol açması beklenmiştir. Fosfat baş bölgesindeki yüzey hidrasyonu, daha yüksek yük elde etmek için fosfat kafalarındaki iyonize durumu desteklenmiştir (Disalvo et al., 2008).

Optimize edilmiş F6, F7, F8 formülasyonlara ait partikül boyutu ve PDI verileri 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür. Formülasyonların partikül boyut değerleri 1200-1600 μ m aralığında tespit edilmiştir. Çok büyük bir farklılık görülmemesine rağmen lutein ilavesinin partikülleri küçülttüğü tespit edilmiştir.

PDI, bir çözeltideki parçacıkların ortalama tek düzeliğini tahmin etmek için kullanılır ve daha büyük PDI değerleri, numunedeki daha büyük boyut dağılımına karşılık gelir. Formülasyonlarda partikül boyutu dağılımı 0.5 civarında bulunmuştur. Bu durum üretim sonrasında herhangi bir partikül küçültme basamağının olmamasından kaynaklanmıştır. Herhangi bir sisteme ilavesi sonrasında homojenizasyon ile partikül boyutu dağılımının küçültülebileceği düşünülmüştür.

Optimize edilmiş 3 formülasyonun stabilite çalışmaları başlatılmış ve halen proje kapsamında devam etmektedir. Birinci ay sonuçları her formülasyon için 3 tekrarlı ölçüm yapılarak değerlendirilmiştir. Formülasyonların stabilitesi kapsamında; zeta potansiyel, partikül boyutu ve PDI verileri elde edilmiştir. Buzdolabında bekletilen (+4°C) örnekler ve 25°C'de %60±5 reletif nemde stabilite kabininde bekletilen formülasyonlarda renk değişimi gözlemlenmezken, 40°C de %75±5 reletif nemde stabilite kabininden çıkarılan örneklerde oldukça hafif bir renk değişimi gözlemlenmiştir.

Formülasyonların mavi ışık kaynaklı hücre canlılığı üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür. İlk olarak oluşturulan mavi ışık düzeneğinin hücreler üzerindeki etkisinin ne kadar zamanda görüldüğü belirlenmiştir. Bu süre 8 saat olarak tespit edilmiştir. Bu sürenin çalışmanın geliştirilmesi için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmanın ardından kullanılan ekstrenin uygun dozunun belirlenmesi amacıyla çalışmalar yürütülmüş ve 5 µg/ml konsantrasyon üzerinde hücre canlılığında azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle 1.25, 2.5 ve 5 µg/ml konsantrasyonları formülasyonları hazırlamak amacıyla seçilmiştir.

Son olarak hücre kültürü çalışmaları kapsamında HEK293T hücre hatlarında 1.25, 2.5 ve 5 µg/ml konsantrasyon içeren formülasyonlar ve ekstre çözeltisinin ROS seviyesini geriye çevirebildiği gözlemlenmiştir. Bu deney HDFa hücre hattı için de aynen tekrar edilmiş ve 5µg/ml ekstre içeren formülasyon en iyi geri dönüşü kontrol hücrelerine göre sağlamıştır. En ideal formülasyonun F6 formülasyon olduğuna karar verilmiştir.

Sonuç olarak marigold ekstresi içeren liposomal toz formülasyonları püskürterek kurutma yöntemi ile başarı ile hazırlanmıştır. Yapılan etkinlik çalışmaları sonucunda yüksek konsantrasyonda ekstre içeren F6 formülasyonu ile en iyi etkinlik elde

edilmiştir. Bu formülasyon mavi ışığın neden olduğu cilt yaşlanma belirtilerini gidermede kozmetik aktif bir madde olarak önerilmiştir.

Çalışma devamında YPSK veya UV spektrofotometre ile analitik yöntem geliştirilecek ve lipozomlara marigold ekstresinin enkapsülasyon kapasitesi belirlenecektir. Ayrıca etkinlik çalışmaları farklı belirteçler ile devam edecektir.



Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, literatür araştırmalarında marigold ekstresini içinde bulunan lutein maddesiyle oluşturulan lipozomlara rastlanmamıştır.

Oluşturulmuş bu formülasyonlar stabilitesinin değerlendirilmesinin ardından kozmetik alanında, bir krem veya serum içerisinde süspande edilerek, kullanılabilir.

Bu alanda tez çalışmamız mavi ışığın neden olduğu cilt yaşlanmasının etkileri üzerinde etken ve özgün bir çalışmadır. Lipozomların HDFa ve HEKn hücre kültür çalışmalarında ROS seviyesini kontrol seviyelerine geri döndürmede etken olduğu görülmüştür.

Ek olarak tasarlanan mavi ışık düzeneği yardımı ile daha farklı hücre hatları üzerinde etkenlik çalışmaları yapılarak, cilt yaşlanmasına karşı engelleyici etkileri belirlenebilir.

Kaynaklar

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H. (2006). Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 58, Issue 15, pp. 1688–1713). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.017>
- Al-Majed, A., Bakheit, A. H., Alharbi, R. M., & Abdel Aziz, H. A. (2018). Mirtazapine. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 43, pp. 209–254). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2018.01.002>
- Alves-Rodrigues, A., & Shao, A. (2004). The science behind lutein. *Toxicology Letters*, 150(1), 57–83. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.10.031>
- Avola, R., Graziano, A. C. E., Pannuzzo, G., Bonina, F., & Cardile, V. (2019). Hydroxytyrosol from olive fruits prevents blue-light-induced damage in human keratinocytes and fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 9065–9076. <https://doi.org/10.1002/jcp.27584>
- Barbosa-Cánovas, G. V. (Gustavo V. (2005). *Food powders : physical properties, processing, and functionality*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Bhandari, B. (2013). Introduction to food powders. In *Handbook of Food Powders: Processes and Properties* (pp. 1–25). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1533/9780857098672.1>
- Boonnoun, P., Opaskonkun, T., Prasitchoke, P., Goto, M., & Shotipruk, A. (2012). Purification of free lutein from marigold flowers by liquid chromatography. *Engineering Journal*, 16(5), 145–155. <https://doi.org/10.4186/ej.2012.16.5.145>
- Coats, J. G., Maktabi, B., Abou-Dahech, M. S., & Baki, G. (2021). Blue Light Protection, Part I—Effects of blue light on the skin. In *Journal of Cosmetic Dermatology* (Vol. 20, Issue 3, pp. 714–717). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jocd.13837>
- Craft, N. E., & Soares, J. H. (1992). Relative Solubility, Stability, and Absorptivity of Lutein and β -Carotene in Organic Solvents. In *Food Chem* (Vol. 40). <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- Disalvo, E. A., Lairion, F., Martini, F., Tymczyszyn, E., Frías, M., Almaleck, H., & Gordillo, G. J. (2008). Structural and functional properties of hydration and

- confined water in membrane interfaces. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1778, Issue 12, pp. 2655–2670). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.025>
- Elkholy, N. S., Shafaa, M. W., & Mohammed, H. S. (2020). Biophysical characterization of lutein or beta carotene-loaded cationic liposomes. *RSC Advances*, 10(54), 32409–32422. <https://doi.org/10.1039/d0ra05683a>
- Hadden, W. L., Watkins, R. H., Levy, L. W., Regalado, E., Rivadeneira, D. M., Van Breemen, R. B., & Schwartz, S. J. (1999). Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4189–4194. <https://doi.org/10.1021/jf990096k>
- Hunter, R. J., Midmore, B. R., & Zhang, H. (2001). Zeta potential of highly charged thin double-layer systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 237(1), 147–149. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7423>
- Hussein, N. (2019). Spray-dried liposomes: A study of the effect of carbohydrate carrier and concentrations on liposome size and drug entrapment. *Zanco Journal of Medical Sciences*, 23(3), 345–353. <https://doi.org/10.15218/zjms.2019.043>
- Ingvarsson, P. T., Yang, M., Nielsen, H. M., Rantanen, J., & Foged, C. (2011). Stabilization of liposomes during drying. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 8, Issue 3, pp. 375–388). <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.553219>
- Jimenez-Escrig SC, A. B., & Sanchez-Muniz Ph D Prf, F. J. (2000). DIETARY FIBRE FROM EDIBLE SEAWEEDS: CHEMICAL STRUCTURE, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES AND EFFECTS ON CHOLESTEROL METABOLISM. In *Nutrition Research* (Vol. 20, Issue 4).
- Kumari, J., Das, K., Babaei, M., Rokni, G. R., & Goldust, M. (2023). The impact of blue light and digital screens on the skin. In *Journal of Cosmetic Dermatology* (Vol. 22, Issue 4, pp. 1185–1190). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jocd.15576>
- Le, V. N. P., Robins, E., & Flament, M. P. (2012). Agglomerate behaviour of fluticasone propionate within dry powder inhaler formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80(3), 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.12.004>
- Lorrio, S., Rodríguez-Luna, A., Delgado-Wicke, P., Mascaraque, M., Gallego, M., Pérez-Davó, A., González, S., & Juarranz, Á. (2020). Protective effect of the

- aqueous extract of *Deschampsia antarctica* (EDAFENCE®) on skin cells against blue light emitted from digital devices. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030988>
- Manzoor, S., Rashid, R., Prasad Panda, B., Sharma, V., & Azhar, M. (2022). Green extraction of lutein from marigold flower petals, process optimization and its potential to improve the oxidative stability of sunflower oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105994>
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. In *Heliyon* (Vol. 8, Issue 5). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
- Ogawa, K., Kuse, Y., Tsuruma, K., Kobayashi, S., Shimazawa, M., & Hara, H. (2014). Protective effects of bilberry and lingonberry extracts against blue light-emitting diode light-induced retinal photoreceptor cell damage in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-120>
- Roberts, R. L., Green, J., & Lewis, B. (2009). Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.01.011>
- Róg, T., & Pasenkiewicz-Gierula, M. (2006). Cholesterol effects on a mixed-chain phosphatidylcholine bilayer: a molecular dynamics simulation study. *Biochimie*, 88(5), 449–460. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.10.005>
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Owen, S. C. (n.d.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients Fifth Edition*.
- SCCS. (n.d.). *Scientific Committee on Consumer Safety SCCS OPINION on Butylated Hydroxytoluene (BHT)*.
- Shin, G. H., Kim, J. T., & Park, H. J. (2015). Recent developments in nanoformulations of lipophilic functional foods. *Trends in Food Science and Technology*, 46(1), 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.005>
- Šivel, M., Kráčmar, S., Fišera, M., Klejdus, B., & Kubán, V. (2014). Lutein Content in Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.) Concentrates used for Production of Food Supplements. In *Czech J. Food Sci* (Vol. 32, Issue 6).
- Ullah Bhuyian, M., Habib Ullah Bhuyian, M., Ariful Islam, A., Isha Tareque, M., & Ar Rashid, H. (n.d.). *DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHOD FOR*

<https://www.researchgate.net/publication/283320998>

- Van Tran, V., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2019). Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 300, pp. 114–140). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.03.003>
- Varma, K., Jude, S., Nair, R. V. R., Varghese, B. A., Jacob, J., Amalraj, A., & Kuttappan, S. (2021). Novel formulation of liposomal lutein using nanofiber weaving (NFW) technology: Antioxidant property and in vitro release studies. *Food Hydrocolloids for Health*, 1. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100025>
- Yu, J. Y., Chuesiang, P., Shin, G. H., & Park, H. J. (2021). Post-processing techniques for the improvement of liposome stability. *Pharmaceutics*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071023>
- Zhao, L., Temelli, F., Curtis, J. M., & Chen, L. (2017). Encapsulation of lutein in liposomes using supercritical carbon dioxide. *Food Research International*, 100, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.055>