

DERİ VE *STRATUM CORNEUM*'UN İNCELENMESİNDE KULLANILAN BİYOFİZİKSEL YÖNTEMLER

Dr. Ecz. M. Sedef Erdal

İ. Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı,
34116 ÜNİVERSİTE, Beyazıt, İstanbul
serdal@istanbul.edu.tr

İnsan derisi, özellikle de derinin engel işlevini üstlenmiş olan SC'un çeşitli özelliklerinin tanımlanması ve topikal uygulanan ürünlerle epidermal biyokimya arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması, derinin bakım ve tedavisine yönelik formülasyonların geliştirilmesine yardımcı olan önemli faktörlerdir (101).

Deri üzerinden gerçekleşen su kaybı, insan derisi ve SC'un nem içeriği ve yüzey lipitlerinin miktarı, derinin mekanik (esneklik ve gerginlik) ve yüzey (kırısklık ve ince çizgiler) özellikleri, epidermal lipitlerin farklı sıcaklık değerleri ve hidrasyon seviyelerindeki davranış biçimleri gibi parametrelerin, *in vivo*, *ex vivo* ve *in vitro* olarak incelenmesi ve uygulanan ürünlerin etkinliğinin ispat edilmesi amacı ile çok çeşitli biyofiziksel yöntemler kullanılmaktadır.

Bu yöntemler kullanılarak yapılan değerlendirmelerde uygun sonuçlar alınabilmesi için bir dizi koşul yerine getirilmelidir. Aşağıda belirtilen bu koşullar, birçok biyofiziksel yöntem için geçerlidir (91):

- Deneyler, şartlandırılmış hava koşulları olan laboratuvar ortamında gerçekleştirilmelidir. Sabit sıcaklık (20-23°C) ve sabit nem (%40-60 bağıl nem) koşulu sağlanmalıdır.
- *In vivo* deneylerde, denekler ölçümlerden en az 30 dakika önce analizin gerçekleştirileceği odada bulunmalı ve analiz süresince odadan dışarı çıkmamalıdır. Bu şekilde ölçümleri etkileyebilecek kısa süreli koşulların etkisi en aza indirilebilir.
- Topikal uygulanan ürünlerin deri üzerindeki etkilerinin ölçülmesinde en uygun vücut bölgesi seçilmelidir. Genellikle kolun iç yüzeyinin kullanılması uygundur.
- Ölçümü yapan kişinin deneyimli olması aranılan bir özelliktir.

Deri Üzerinden Gerçekleşen Su Kaybının (TransEpidermal Su Kaybı, TransEpidermal Water Loss, TEWL) İzlenmesi

Derinin engel işlevindeki değişiklikleri izlemeye yönelik olarak kullanılan biyofiziksel yöntemlerden en bilineni, Evaporimetre (Evaporimeter), Tewa-Metre (TEWA-Meter) ve DermaLab olarak tanımlanmış cihazlar yardımı ile transepidermal su kaybının (TransEpidermal Water Loss, TEWL) ölçülmesidir. TEWL'nın oranı SC bütünlüğü ve sağlığının bir göstergesidir. Birçok deri hastalığının TEWL'nın artması ile birlikte seyrettiği belirlenmiştir (8, 73, 93, 95, 99-102, 118, 150, 151, 191).

Normal koşullar altında derinin hidrasyon seviyesi %10'un altına düşmemelidir. Deri lipitlerinin organik çözücüler ile ekstraksiyonu veya yapışkan bant ile soyma işlemi uygulanarak korneosit ve lipitlerin uzaklaştırılması, TEWL'nı artırır. Bu artış, epiderminin alt tabakalarına sinyaller aracılığı ile haber verilerek hücrelerarası lipitlerin yenilenmesi ve engel işlevinin tamiri sağlanır. TEWL'nın izlenmesi ile tamir cevabının ne kadar sürdüğü saptanabilir (79, 118).

Derinin engel işlevini tamire yönelik olarak hücrelerarası lipitleri içeren formülasyonlar geliştirilmiştir. Seramit ve yağ asitlerinin tek başlarına veya ikili karışımlar halinde kullanıldıklarında tamiri geciktirdikleri saptanmıştır. Sadece hücrelerarası lipitlerin tam karışımları veya tek başına kolesterol varlığında derinin engel işlevinde iyileşme görülmüş ve TEWL azalmıştır (101, 150).

Deri Neminin ve Yüzey Lipitlerinin İzlenmesi

Deri ve SC nem seviyesinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntem elektriksel kapasitenin ölçülmesidir. Bu amaçla Korneometre (Corneometer) olarak tanımlanan cihaz kullanılmaktadır (26, 223). Korneometre elektrodu deriye uygulandığında, su ve ilgili iyonların sirkülasyonunu, dolayısı ile epidermal hidrasyona bağlı olarak değişen elektrik kapasitesini ölçmektedir. Korneometre ile yapılan nem ölçümlerinde, SC'un 20 nm derinlikteki su içeriği belirlenmektedir. 1 Korneometre ünitesi, 0.02 mg/cm²'deki su içeriğine eşdeğerdir (75, 173, 187). Ölçümlerde, deri yüzeyinin

elektrot ile tam olarak temas etmesi sonuçlarda kararlılığın sağlanması bakımından elzemdir (150).

Deri neminin ölçülmesinde Korneometre'nin yanı sıra, aynı prensiple çalışan Skicon®-200 ve DPM®-9003 cihazları da kullanılmaktadır (82, 91). Deri ve SC hidrasyon seviyesinin izlenmesinde kullanılan spektral bir yöntem Teorik Kısım 3. 4. 6. 3'de anlatılmıştır.

Deri yüzey lipitleri daha çok yağ bezlerinden üretilen sebum kaynaklıdır ve derinin engel işlevi üzerinde belirgin bir etkiye sahip değildir. Ancak akne ve seboreik dermatit gibi bazı deri hastalıkları, artan sebum salgısı ile ilişkili olduklarından, sebum salgısının azaltılmasına yönelik araştırmalar devam etmektedir.

Deri yüzeyine doğrudan yapıştırılabilen polimerik bir film olan Sebutape, yüzey lipitlerini absorbe ettiğinde rengini değiştirmekte ve oluşan renk üzerinden, sebum salgılanma oranı, salgılanan toplam miktar gibi parametreler tayin edilebilmektedir.

Fotometrik bir cihaz olan Sebumetre (Sebumeter) ile yapılan ölçümlerde ise, pürüzlü yüzeye sahip olan plastik bir film deri yüzeyine bastırılarak, yüzey lipitlerinin filme geçmesi sağlanmaktadır. Lipitler, yüzeydeki boşlukları dolduracak şekilde yayılarak plastik filmin ışığa karşı geçirgenliğini arttırmaktadırlar. Cihaz, 1 cm²'deki yüzey lipitlerinin miktarını, ışık geçirgenliğinde oluşan fark üzerinden belirlemekte ve µg cinsinden vermektedir (91, 173).

Derinin Mekanik ve Yüzey Özelliklerinin İzlenmesi

Derinin, özellikle de SC'un mekanik özelliklerinin ölçülmesi kolay bir işlem değildir. Deri esneklik ve gerginliğinin analizinde kullanılan cihazlardan en bilinenleri, Kütometre (Cutometer) ve Dermal Torkmetredir (Dermal Torquemeter).

Kütometre ile yapılan ölçümlerde, deri yüzeyine 50-500 mbar arasında değişen vakum değerleri uygulanarak gerek yüzeyin gerekse daha derin tabakaların esneklik ve viskozite değerleri hesaplanabilmektedir.

Dermal Torkmetre cihazı ile deri yüzeyine paralel bir güç uygulanarak daha çok yüzeye yakın kısımların mekanik özelliklerine ait bilgiler elde edilmektedir. Tekrarlanabilirlik ve doğruluk bakımından sorunların yaşanabildiği bir analiz yöntemidir.

Deri yüzeyi, 0.05 µm'den birkaç mm'ye kadar değişebilen derinlikte çizgi ve kırışıklıklar taşıyabilmektedir. Bu çizgi ve kırışıklıklar, dermis ve SC'un işlevsel durumunu ve hidrasyon seviyesini yansıtır. Deri yüzeyindeki çizgi, kırışıklık ve pürüzlerin incelenmesinde polimerize silikon ile elde edilen deri kopyaları veya canlı deri örnekleri kullanılabilir.

Taramalı Elektron Mikroskopisi (Scanning Electron Microscopy, SEM) pahalı bir teknik olmakla birlikte, SC yüzeyinin hücre içi ve hücrelerarası yapısının araştırılmasında çok uygundur. Deri yüzeyinin bir video kamera ile UV ışık kaynağı altında incelenmesine olanak veren Visioscan isimli cihaz da derinin pürüzlülüğü konusunda bilgi sağlamaktadır (91).

Bütün bu yöntemlere ek olarak, Lazer Doppler Akışmetre (Laser Doppler Flowmeter) veya Lazer Doppler Hızmetre (Laser Doppler Velocimeter) cihazları ile test edilen deri bölgesinde kan akışının ölçümü ve bazı deri hastalıklarında deri renginin bir kolorimetre yardımı ile belirlenmesi, derinin engel işlevine yönelik klinik bulguların tanımlanmasında fayda sağlamaktadır (55, 99, 100, 223).

Stratum corneum Hücrelerarası Lipitlerinin Yapı ve Davranışlarının İzlenmesi

Deri üzerinden gerçekleşen su kaybı, nem içeriği, yüzey lipitleri, mekanik ve yüzey özellikleri sürekli olarak geliştirilen ve yenilenen farklı cihazlarla incelenirken, SC hücrelerarası lipitlerinin yapısı ve epidermisin işlevsel özelliklerinin araştırılmasında, X-Işını Dağılımı (X-Ray Diffraction), Elektron Dağılımı (Electron Diffraction), Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (Differential Scanning Calorimetry, DSC), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Elektriksel Direnç Spektroskopisi (Impedance Spectroscopy, IS) ve Infrared (IR) Spektroskopisi gibi çok çeşitli biyofiziksel yöntemler kullanılmaktadır (15, 69, 72, 73, 158, 159). Bu yöntemlerden en çok çalışılanları aşağıda ele alınmıştır:

X-Işını Dağılımı ve Elektron Dağılımı Yöntemleri

Dar ve geniş açılı x-ışını dağılımı yöntemleri ile SC lipitlerinin tabakalı yapıları ve özellikle derinin engel işlevinde büyük öneme sahip olan katı kristalize, jel ve sıvı kristalize faz düzenleri hakkında bilgi edinilmiştir (15, 93, 155, 175).

Dar Açılı X-Işını Dağılımı (Small Angle X-Ray Diffraction, SAXD) yöntemi ile gerçekleştirilen çalışmalar, insan SC'daki hücrelerarası lipitlerin 6.4 nm ve 13.4 nm tekrarlanma aralıkları ile paralel çifte tabakalar halinde düzenlendiğini göstermiştir. Lipit alkil zincirleri sıkı düzende ve hareketsizdir. Diğer hücre zarlarındaki lipitlerin aksine, fizyolojik sıcaklık değerlerinde sıvı kristal yapı sergilemezler (14-16, 73, 159, 162, 206). Özellikle 13.4 nm'lik tekrarlanma aralığının derinin engel işlevinde rol oynadığı düşünülmektedir. Çeşitli tipte dermatozu olan hastalarda hücrelerarası lipit tabakaların tekrarlanma aralıklarının kısaldığı gözlenmiştir (15, 17, 57).

Geniş Açılı X-Işını Dağılımı (Wide Angle X-Ray Diffraction, WAXD) ve Elektron Dağılımı yöntemleri ise, SC keratin ve su içeriği ile hücrelerarası lipitlerin yanal düzenleri hakkında bilgi sağlamaktadır (14, 73, 157)

Kalorimetrik Yöntemler

Lipitlerin polimorfizmi, derinin geçirgenliği üzerinde önemli etkiye sahiptir. Bu nedenle gerek domuz ve insan SC'ü gerekse model lipit karışımları üzerinde hücrelerarası lipitlerin termal davranışları çalışılmıştır (90, 94, 124, 206).

Diferansiyel Tarama Kalorimetresi (Differential Scanning Calorimetry, DSC) ile yapılan termal analiz çalışmaları, SAXD ve WAXD analizleri ile paralel yürütülerek, SC'daki hücrelerarası lipitlerin yapısal düzeni ile ilgili bilgiler sağlanmıştır. İnsan SC lipitlerinin, 30-120 °C arasında termal analiz uygulandığında, 37 °C, 60-65 °C, 80-85 °C ve 95-110 °C'de, 4 adet endotermik geçiş gösterdiği görülmüştür. Endotermik geçişin gerçekleştiği sıcaklık derecesinin, SC hidrasyon seviyesinden etkilendiği belirlenmiştir (16, 25, 73). Buna karşılık, X-Işını Dağılımı ve IR çalışmaları,

fizyolojik sıcaklık değerlerinde lipit alkil zincirlerinin düzen ve hareketliliği üzerinde hidratasyon seviyesinin etkisinin bulunmadığını göstermiştir (16).

İlk üç endotermik geçiş, lipitlerin termal davranışına ithaf edilirken, sonuncusunun SC'un protein bileşeninden, keratinden, kaynaklandığı düşünülmektedir. DSC analizleri, korneositlerin ana bileşeni olan keratinin çok kararlı bir yapı sergilediğini ve ancak 95°C yi aşan sıcaklıkta denatüre olarak termal faz geçişi gösterdiğini belirlemiştir (94, 174). 51-55°C'deki beşinci bir termal geçişin, kornife zarfın dışında yer alan kovalan bağlı lipitlerden kaynaklandığı bildirilmiştir (94).

Kolesterol, serbest yağ asitleri ve seramitlerden oluşan model lipit sistemlerinin araştırılmasında DSC yöntemi kullanılmıştır. Seramit bileşiminin lipit sistemin çoklu tabaka düzenini etkilediği saptanmıştır (56).

D-limonen ve 1-8 sineol isimli iki terpen bileşiğinin, SC'un geçirgenliğini arttırmaları üzerinde yapılan bir araştırmada, DSC tekniği kullanılarak hücrelerarası lipitlerin faz davranışları ile ilgili bilgi edinilmiştir. Her iki terpenin de, lipit faz geçiş sıcaklığını düşürdüğü saptanmış ve lipit alkil zincirlerinin düzeninin bozulduğuna karar verilmiştir (30).

Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi

Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) çalışmaları, kornesitleri çevreleyen kornife zarf proteinleri ile ilgili bilgi sağlamış ve normal koşullar altında bu proteinlerin katı yapıda oldukları saptanmıştır (174). Kornife zarfın kırılabilirliğinin artması, derinin engel işlevinin azalmasına neden olmakta ve bu durum çeşitli deri hastalıklarını beraberinde getirmektedir.

NMR tekniği ile *in vivo* ve *in vitro* olarak, deriyi nemlendirmeye yönelik ürünlerin etkinliği de ölçülebilmektedir (63).

Elektriksel Direnç Spektroskopisi

Elektriksel Direnç Spektroskopisi (Impedance Spectroscopy, IS), derinin elektriksel özelliklerindeki değişkenliği ölçen bir yöntemdir. Derinin elektriksel özelliği hidrasyon seviyesine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (32).

Raman Spektroskopisi

Raman Spektroskopisi'nin SC hidrasyon seviyesinin tayininde kullanılabileceği belirtilmiştir. Deri yüzeyinden aşağılara inildikçe SC hidrasyon seviyesinin %15'ten %25'e çıktığı ve *Stratum granulosum*/SC ara yüzeyinde %40 değerine ulaştığı saptanmıştır (22). Raman spektroskopisi deri ve deriye uygulanan topikal ürün etkileşimlerinin araştırılmasında da kullanılan uygun bir yöntemdir (159). IR Spektroskopisi ile karşılaştırıldığında, polar olmayan gruplara hassasiyetinin daha fazla olması nedeni ile, lipidlerin yapısal özelliklerinin tanımlanmasında kullanılmıştır (94). Mikroskopik tekniklerle birlikte, SC hidrasyonu, NMF ve keratin oranlarının ölçülmesinde yararlanılan Raman Spektroskopisi, derinin engel işlevi ve lipid profili bakımından önemli bulgular sağlamıştır (1).

Infrared (IR) Spektroskopisi

Infrared (IR) spektroskopisi derinin, özellikle de SC'un engel işlevinin daha iyi anlaşılmasına yönelik araştırmalarda kullanılan, SC yapı ve dinamiğine ilişkin çok önemli bulgular sağlayan biyofiziksel bir yöntemdir (116, 117, 191). Elektromanyetik enerji ile etkileşimde bulunulması sonucunda meydana gelen moleküler hareketleri belirlemektedir (131).

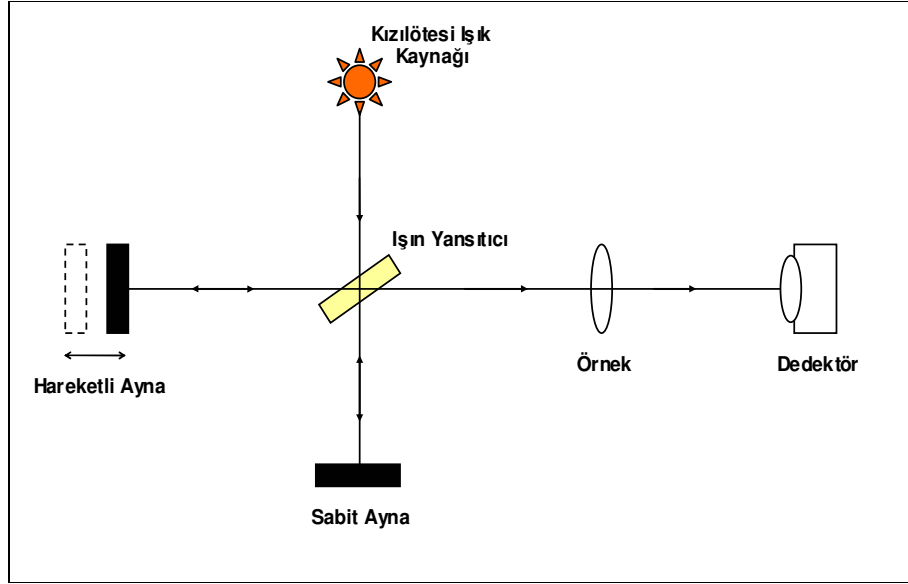
Elektromanyetik spektrumun orta IR aralığı ($4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$), birçok işlevsel gruba ait titreşimlerden kaynaklanan absorpsiyon bantlarını içermektedir. IR spektrumundaki her bir absorpsiyon bandı, absorpsiyon maksimumunun dalga sayısı, bant genişliği ve gücü ile tanımlanmaktadır. Bir absorpsiyon bantına ait dalga sayısı, buna neden olan moleküler hareket, kimyasal bağda yer alan atomlar ve

çevrelerinin konformasyonu için karakteristiktir. Diğer taraftan bant genişliği ve gücü moleküllerin hareket oranı ile doğru orantılıdır.

Fourier Dönüşümlü IR Spektroskopi (Fourier Transformed IR Spectroscopy, FTIR) yöntemi, spektral bilgilerin alışımlı IR spektroskopisine oranla çok daha iyi çözünürlük ile elde edilmesini, hızlı, hassas ve doğru analiz yapılmasını sağlamaktadır (131, 185). Bu yöntemle çok bileşenli örneklerin çalışılması mümkündür. Bir absorbansa ait dalga numarasının saptanma doğruluğu, FTIR yöntemi ile 0.01 cm^{-1} den fazla olmaktadır (58).

FTIR Spektrometresinin en önemli bileşeni, Michelson interferometresidir (Şekil 8). Bir FTIR analizi yapılırken, interferometre ardışık olarak şu işlemleri gerçekleştirir:

1. IR kaynağından gelen ışığı, ışık yansıtıcı aracılığı ile ikiye böler.
2. Işık, biri sabit diğeri değişken uzunlukta iki ayrı optik yol üzerinden nakledilir. Hareketli ayna, bir analiz süresince ileri geri hareket ederek optik yoldaki değişkenliği sağlar.
3. İki ışık yeniden birleşir ve optik yol uzunluğunun farkının bir sonucu olarak girişim oluştururlar.
4. Bu ışığın yarısı örnek içinden geçerken, örnek tarafından absorplanmayan ışık detektöre ilerler. Detektörde iki ışının karışımından kaynaklanan ve interferogram adı verilen girişimin oluşması, analizi yapılan örnekle ilgili spektral bilgilerin oluşmasını sağlar (107, 131).

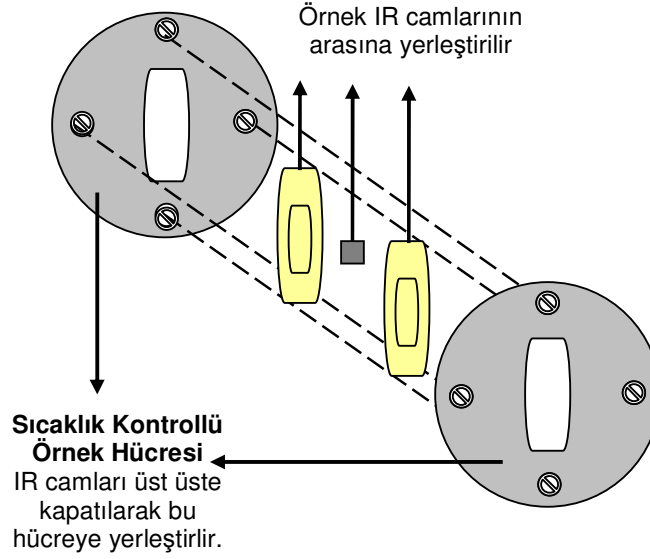


Şekil 8. Michelson İnterferometresinin Bileşenleri (106)

FTIR yöntemi ve bu yöntemin iki farklı tekniği olan Transmisyon (Transmission) ve Hafifletilmiş Toplam Yansıtma (Attenuated Total Reflectance, ATR) FTIR spektroskopileri lipid membranların faz davranışlarının araştırılmasında yoğun olarak kullanılmış ve insan SC'unun yapısı ve SC tabakasındaki hücrelerarası lipidlerin alkil zincirlerinin konformasyonu hakkında bilgi kazanılmıştır (56, 158, 159).

3. 4. 6. 1. Transmisyon– FTIR Spektroskopisi

Transmisyon-FTIR spektroskopisi gerek SC lipid tabakalarının gerekse model lipid karışımlarının sıcaklığa bağlı faz davranışlarının araştırılması için yaygın biçimde kullanılmaktadır (70, 89, 145, 158, 159, 185, 202). 10-20 μm kalınlığındaki SC tabakası, Transmisyon-FTIR yöntemi ile analize uygun bir yüzeydir. SC'dan elde edilen spektrum, lipid, protein ve suya ait absorpsiyonlar ile tanımlanmaktadır (131, 158).



Şekil 9. Transmisyon-FTIR Tekniği ile Çalışma Adımları

SC örneği, genellikle kalsiyum florür veya baryum florürden yapılan, teflonla kaplanmış iki IR camı arasına yerleştirilir (Şekil 9). Özellikle, kalsiyum florürden yapılmış olan IR camları, birçok asit ve baza karşı dirençlidir, yüksek sıcaklık ve basınç altında çalışmasına olanak verir. Bu özel camların yüzeylerine elle temastan kaçınılmalı, uzun süreli olarak ışığa maruz kalmamalarına özen gösterilmelidir. Üst üste kapatılan IR camlarının sıcaklık kontrollü hücreye yerleştirilmesinin ardından hücre bir taşıyıcı yardımı ile spektrometrenin örnek bölmesine yerleştirilerek gerekli bağlantıları yapılır (117). Sıcaklık kontrolü için IR hücresinin ilgili kısmına bir sıcaklık pili (thermocouple) bağlanabilmektedir.

3. 4. 6. 2. Hafifletilmiş Toplam Yansıtma (Attenuated Total Reflectance, ATR) - FTIR Spektroskopisi

Derinin engel işlevinin araştırılmasında önemli bir yöntem, özel bir IR tekniği olan Hafifletilmiş Toplam Yansıtma (Attenuated Total Reflectance, ATR) spektroskopisidir. Transmisyon-FTIR yönteminin başarı ile uygulanamadığı durumlarda sıklıkla kullanılan yansıtma teknikleri sınıfına girmektedir (159). FTIR spektroskopisinin, *in vitro* ölçümlerin yanı sıra *in vivo* SC değerlendirmelerinde de geniş oranda fayda sağlayan bir teknik halini alması, ATR-FTIR yöntemi sayesinde gerçekleşmiştir (131).

Transmisyon-FTIR tekniğinde örnek, IR ışının geçiş yolu üzerine konulmaktadır. Buna karşılık ATR-FTIR yönteminde örnek, IR'ye geçirgen olan özel bir kristalin yüzeyi ile temas ettirilir. ATR-FTIR hücrelerinde kullanılan kristaller genellikle çinko selenürden yapılmaktadır; su, organik çözücüler, zayıf asit ve bazlara karşı dirençlidirler. Ölçülecek ışık demeti kristal üzerinden, örnek-kristal ara yüzeyinde yansiyacak şekilde yönlendirilmektedir. Kristalin trapezoidal şeklinin bir sonucu olarak IR ışın kristale kritik açıdan (kritik açı: gelen bütün ışının yansıdığı açı) daha düşük bir açıda girer. Birçok iç yansımaya uğrar ve yeniden dedektöre döner. Bu nedenle kristal, iç yansıtma elemanı (Internal Reflectance Element, IRE) olarak da tanımlanır.

ATR-FTIR yönteminde, IR radyasyonun penetrasyon derinliği dalga boyu ile doğru orantılıdır ve hassasiyet örnek IRE'nin yüzeyinden uzaklaştıkça azalır. Çalışılacak bölgenin kristal ile doğrudan teması sağlanabilir veya alınan örnek parçaları kristal üzerine konularak ölçüm yapılabilir (11, 12, 21, 72, 131, 159, 185).

Deri söz konusu olduğunda, IR radyasyonun penetrasyon derinliği, cihaza, ATR kristaline, ilgilenilen dalga boyuna ve örneğin hidrasyon seviyesine bağlı olarak 0.3-3 μm arasındadır. Dolayısı ile deri, bu teknik ile doğrudan analiz edildiğinde, tek bir ATR-FTIR spektrumundan elde edilen bilgi kristal ile temas eden ilk tabakalara aittir. SC'un daha derin kısımları ile ilgili bilgiler, yapışkan bant ile soyma yöntemi sonucunda elde edilebilir (11, 131, 159). ATR-FTIR yöntemi ile *in vivo* olarak elde edilen insan SC'a ait spektrumun genel özellikleri, Transmisyon-FTIR yöntemi ile elde edilenle aynıdır (12).