

# Vernix Caseosa'nın İnsan Derisi ile Etkileşiminin Biyofiziksel Yöntemler Kullanılarak Araştırılması

## INVESTIGATION OF THE INTERACTION OF VERNIX CASEOSA WITH HUMAN SKIN USING BIOPHYSICAL METHODS

M. Sedef ERDAL,<sup>a</sup> Dr. Ahmet ARAMAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Farmasötik Teknoloji AD, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İSTANBUL

### Özet

**Amaç:** İnsan derisi, vücudu kimyasal ve mikrobiyal zararlı etkenlerden korurken aynı zamanda vücut sıcaklığını düzenlemekte ve vücuttan su kaybını önlemektedir. Derinin en dış tabakası Stratum corneum, derinin engel işlevi üzerinde önemli etkiye sahiptir. Vernix caseosa, anne rahmindeki fetusu hamileliğin son döneminde kaplayan, koruyucu özelliğe sahip, doğal yapıda, biyolojik bir filmidir. Vernix caseosa bileşiminde su, yağ bezlerinden sentezlenen lipitler ve Stratum corneum hücrelerarası lipitleri yer alır. Erken doğan bebeklerde, deri yüzeyinde Vernix caseosa'nın eksikliği enfeksiyona yatkınlık, deri üzerinden yüksek oranda su kaybı ve vücut sıcaklığının kontrolünün zorlaşması gibi problemlere yol açmaktadır. Bu problemlerin önlenmesi için deri üzerinde bariyer oluşturan yağlar veya yağ ağırlıklı topikal ürünler kullanılmaktadır. Ancak Vernix caseosa'yı yüksek su içeriği ve deriyi nemlendirme etkileri konusunda daha iyi taklit edebilecek yeni formülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda, Vernix caseosa'nın deri hidrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amacı ile panel testleri gerçekleştirilmiştir. Tam zamanlı doğmuş bebeklerin deri yüzeyinden toplanan Vernix caseosa örneklerinin, normal deri üzerindeki nemlendirici ve aseton etkisi ile kurumuş deri üzerinde onarıcı etkileri, Korneometre cihazı ve ATR-FTIR Spektroskopisi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen panel testleri ile doğrulanmıştır.

**Bulgular:** *In vivo* koşullarda, anatomik bölgeye bağlı olduğu bilinen hidrasyon, lipit bileşimi ve alkil zincirlerinin yapısal düzeni gibi biyofiziksel parametrelerin Vernix caseosa uygulaması sonucunda değiştiği görülmüştür.

**Sonuç:** Elde edilen bulgular Vernix caseosa eksikliğinde alternatif olarak kullanılabilir, ayrıca yetişkinlerde kuru deri belirtisi ile birlikte seyreden deri hastalıklarında deri hidrasyonunu arttırmaya ve derinin engel işlevini korumaya yönelik olarak kullanılabilir formülasyonların geliştirilmesinde kullanılacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Deri; Vernix caseosa

Türkiye Klinikleri J Dermatol 2007, 17:171-179

Geliş Tarihi/Received: 31.01.2007 Kabul Tarihi/Accepted: 13.03.2007

**Yazışma Adresi/Correspondence:** M. Sedef ERDAL  
İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,  
Farmasötik Teknoloji AD, İSTANBUL  
sedeferdal@gmail.com

Copyright © 2007 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Dermatol 2007, 17

### Abstract

**Objective:** Human skin regulates heat and water loss from the body whilst preventing the ingress of noxious chemicals or microorganisms. The main barrier of the skin is located in the outermost layer of the skin, the Stratum corneum. In utero, during the last trimester of gestation, the fetus is covered by a protective biofilm called Vernix caseosa which mainly composed of water, proteins, sebaceous and epidermal lipids. In preterm delivery the absence of Vernix caseosa results in a much higher risk for infectious diseases and a poor temperature control of the newborn. For these reasons preterm infants are often covered with oils or oil based topical preparations. However there is a strong need to mimic Vernix caseosa more closely, especially with respect to its high water holding capacity and hydration effects.

**Material and Methods:** In our study panel tests were performed to investigate the impact of Vernix caseosa on skin hydration. The positive effect of Vernix caseosa harvested from the skin surface of full term infants has been confirmed with panel tests performed with Corneometer and ATR-FTIR Spectroscopy on normal and acetone induced dry skin.

**Results:** It has been observed that, *in vivo*, biophysical parameters such as hydration, lipid composition and conformation of the aliphatic chains are dependent on the anatomic site and we have seen that these parameters has been changed after Vernix caseosa application.

**Conclusion:** The results obtained will be used to develop new formulations which can be used as a new alternative to improve the protection of preterm infants after birth by absence of Vernix caseosa and by treatment of diseased dry skin in adults, which often parallels an impaired barrier function.

**Key Words:** Skin; Vernix caseosa

**D**oğum öncesi (prenatal) dönemde, derinin en üst tabakası olan *Stratum corneum*'ün (SC) oluşmaya başlaması ile birlikte, yağ bezlerinden salgılanan sebum lipitlerinin deri yüzeyini kapladıkları ve sulu rahim kompartımanı ile gelişimini sürdürmekte olan deri arasında koruyucu

cu, hidrofobik bir engel oluşturdukları düşünülmektedir. SC olgunlaşırken bazı korneositler de yüzeyden ayrılarak bu lipit tabakanın içine gömülmektedir. *Vernix caseosa* (VC) olarak tanımlanan bu yapının doğum öncesi dönemde üstlendiği önemli görev, gelişmekte olan epidermal bariyeri, fetusun içinde bulunduğu rahim içi sıvının zarar verici etkisinden korumaktır.<sup>1</sup>

Anne rahmindeki fetusu, hamileliğin son 3 aylık döneminde kaplayan VC'nın gerek yapısal gerekse işlevsel açıdan SC ile benzerlikler taşıdığı düşünülmektedir.<sup>2</sup> Yaklaşık olarak %80 su, %10 protein ve %10 oranında da lipit içeren VC yapısında, korneositler hidrofilik bölgeleri oluştururken, lipitler de hidrofobik kısmı meydana getirmektedir. VC bileşiminde yer alan yüksek miktardaki suyun önemli bir bölümünün korneositler içinde olduğu düşünülmektedir. Su ile dolu olan VC korneositleri hücre sel süngerler gibi davranarak, amniyotik sıvının fetusun derisi üzerindeki hareketini hafifletmektedirler.<sup>2,3</sup>

Yüksek miktardaki skuale n ve mum esteri içeriği VC lipitlerinin esas olarak yağ bezlerinden türediğini göstermektedir. Yüksek Basıncılı İnce Tabaka Kromatografisi ile yapılan son çalışmalar, VC lipit bileşiminde SC'da yer alan hücrelerarası lipitlerin tamamının bulunduğunu göstermiştir. Seramitler, kolesterol ve serbest yağ asitlerinin karışımından meydana gelen epidermal lipitler, VC lipitlerinin %30 unu oluşturmaktadır.<sup>2,4</sup>

Erken doğan bebeklerin derisi artan transepidermal su kaybı (TEWL) ve bunun sonucunda derinin kuruması, yüksek perkütan absorpsiyon, deri travmasına ve enfeksiyona yatkınlıkla karakterize edilmektedir. Bu durum, epidermal engel işlevinin yetersizliği ve deri yüzeyinde VC eksikliğinin bir sonucudur. 24-28 haftalık doğan bebeklerde, TEWL oranının, suyun kendi halinde buharlaşması ile elde edilen değerlerden pek bir farkı bulunmamaktadır. Bu durumda vücuttaki yaşamsal sıvıların dengesinin ve vücut sıcaklığının korunması büyük bir problem olmaktadır. Oysa tam zamanlı doğmuş bebeklerde derinin engel işlevi gelişmiştir. Epidermis kalınlığı tam zamanlı doğanlarda 50 µm olarak belirlenmişken, erken doğumlarda bu kalınlık 27 µm'ye düşmektedir.<sup>1,2,5</sup>

VC'nın gerek doğum öncesinde rahim içi yaşamda, gerekse doğum sonrasında birden fazla işlevi olduğu düşünülmekte ve bu işlevleri arasında özellikle TEWL'na karşı çok etkin bir bariyer olması, nemlendirme etkisi, antienfektif ve antioksidan etkiler taşıması ve yara iyileşmesini hızlandırıcı etkisi ön plana çıkmaktadır.<sup>6</sup>

Erken doğumlarda, derinin engel işlevinin iyileştirilmesine yönelik olarak, oklüzif etkili film veya yağ bazlı merhemlerin kullanılması söz konusudur. VC'yı deri üzerinde engel oluşturan yağlar ve yağ bazlı merhemlerden farklı kılan özellikleri korneositler ve fizyolojik lipitleri barındırması ve yüksek su içeriğidir.<sup>3</sup> VC, hareketli veya sıvı SC olarak da tanımlanmaktadır. Bu bakış açısı, insan derisi yüzey lipit filminin oluşumunda, yağ bezlerinden sentezlenen lipitlerin görevlerinin ve korneositlerle etkileşimlerinin çalışılmasına önem kazandırmaktadır.<sup>4,7</sup>

SC hücrelerarası lipit tabaka içine gömülü, yassı ve keratinle dolu ölü hücreler olan, 10-15 tabaka halindeki korneositlerden oluşur. Hücrelerarası lipitler SC içinde devamlılık gösteren tek bölgedir ve maddelerin deriden geçişinde önemli bir engel oluştururlar. Kuru haldeki SC yaklaşık olarak 10 µm kalınlığındadır. *Stratum compactum* (korneositlerin daha sıkı bir arada bulunduğu alt kısım) ve *Stratum disjunctum* (korneositlerin gevşek ve daha seyrek bir dizilim gösterdiği üst kısım) olarak iki ayrı tabakada incelenebilmektedir. Her ne kadar canlı bir doku olarak tanımlanamasa da, SC, birçok enzimatik reaksiyonun düzenli olarak gerçekleştiği, dinamik bir yapıdır.<sup>8,9</sup>

Derinin hidrasyon durumu, dermatolojik, kozmetik ve farmasötik açılardan oldukça ilgi çekmektedir. Bunun bir nedeni derinin, özellikle de SC'un hidrasyon derecesinin derinin dış görünüşünü de doğrudan etkilemesidir. Dermatolojik açıdan bakıldığında, yeterli hidrasyon seviyesi sağlıklı derinin bir göstergesidir. Kuru deri ise işlevsel bozukluğa işaret etmektedir.<sup>10,11</sup> Dokunun hidrasyon seviyesinin korunması, çeşitli enzimlerin düzenli çalışabilmesi açısından da önem taşır. SC'un %5-30 aralığındaki su içeriği, esas olarak suyu bağlama özelliğine sahip bileşiklerin sayısı ve cinsine bağlıdır. Ancak, çevresel nem, yaş, patolo-

jik koşullar, deterjanlar ve nemlendirici ürünler ile muamele sıklığı gibi bir dizi faktörden de etkilenmektedir. Lipit içerik kişilere ve ilgilenilen vücut bölgesine göre değişebilmekle birlikte, ana bileşenleri seramitler, serbest yağ asitleri, kolesterol, kolesterol sülfat ve sterol/mum esterleridir. Derinin organik çözücüler ve deterjanlarla teması sonucunda lipit bileşimi değişebilir ve bu da derinin engel işlevini azaltmaktadır.<sup>12-15</sup>

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.

Deri üzerinden gerçekleşen su kaybı, insan derisi ve SC'un nem içeriği ve yüzey lipitlerinin miktarı, derinin mekanik (esneklik ve gerginlik) ve yüzey (kırıklık 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.<sup>16,17</sup>

Deri ve SC nem seviyesinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntem elektriksel kapasitenin ölçülmesidir. Bu amaçla Korneometre (Corneometer) olarak tanımlanan cihaz kullanılmaktadır. 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/cm<sup>2</sup>'deki su içeriğine eşdeğerdir. Ölçümlerde, deri yüzeyinin elektrot ile tam olarak temas etmesi sonuçlarda kararlılığın sağlanması bakımından elzemdir.<sup>16</sup>

Fourier Dönüşümlü IR Spektroskopisi (Fourier Transformed IR Spectroscopy, FTIR) yöntemi, spektral bilgilerin alışılmış IR spektroskopisine oranla çok daha iyi çözünürlük ile elde edilmesini, hızlı, hassas ve doğru analiz yapılmasını sağlamaktadır. Bu yöntemle çok bileşenli örneklerin çalışıl-

ması mümkündür. Bir absorbansa ait dalga numarasının saptanma doğruluğu, FTIR yöntemi ile 0.01 cm<sup>-1</sup> den fazla olmaktadır.<sup>18-20</sup>

Hafifletilmiş Toplam Yansıtma (Attenuated Total Reflectance, ATR) FTIR spektroskopisi yöntemi derinin engel işlevinin *in vivo* araştırılmasında önem kazanmış özel bir IR tekniğidir. Bu yöntemde 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 yansıyacak şekilde yönlendirilmektedir. Kristalin trapezoidal şeklinin bir sonucu olarak IR ışın kristale kritik açıdan (kritik açı: gelen bütün ışığın 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. 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.<sup>21-23</sup>

ATR-FTIR tekniği özellikle deri hidrasyon oranının ölçülmesi ve deri üzerinde penetrasyon arttırıcı maddelerin etkisinin araştırılması için kullanılmaktadır. Ayrıca lipit membranların faz davranışlarının incelenmesinde yoğun olarak kullanılmıştır.<sup>23</sup>

## Gereç ve Yöntemler

### *Vernix caseosa*

VC örnekleri Şubat 2004'de, 6 farklı donörden, Süleymaniye Doğumevi, İstanbul'dan sağlanmıştır. Tam zamanlı doğmuş bebeklerin sırt ve omuz bölgelerinden toplanan örnekler kullanımlarına kadar (toplam 15 gün süre ile) 4 ± 1°C'de buzdolabında, ağzı çok sıkı kapatılmış, steril plastik tüplerde bekletilmiştir. Böylece VC'nin hava ile etkileşmesi ve içeriğindeki suyun buharlaşma yolu ile kaybı engellenmiştir. Örneklerin gözle fiziksel kontrolünde, renk değişimi, kuruma, faz ayrımı (yüzeyde su damlacıklarının belirmesi), kan ile kontaminasyon, bakteriyolojik üreme gibi faktörler incelenmiştir.

### Panel Testleri

Çalışmamızda gerçekleştirilen panel testlerinde yer alan gönüllü denekler, etik kurul izni ile ve Helsinki Deklarasyonu prensiplerine uygun olarak çalışmışlardır.

### Korneometre ile gerçekleştirilen panel testleri

VC'nın SC hidrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması ve etkinlik bakımından bir karşılaştırma yapılabilmesi için, Korneometre (Courage Khazaka, Germany) cihazının kullanıldığı ve deri yüzeyinin elektriksel kapasitesinin ölçümü esasına dayanan 2 ayrı panel testi gerçekleştirilmiştir. Dene sonuçlarının anlamlılığı ANOVA istatistik Testi ile değerlendirilmiştir.

### Normal deride nemlendirici etkinliğin araştırılması

Normal deride nemlendirici etkinliğin araştırıldığı birinci panel testine, 19-57 yaş aralığında 10 kadın ve 2 erkek gönüllü denek, imzaladıkları "Gönüllü Protokolü" çerçevesinde katılmıştır. Uygulama alanı olarak deneklerin ön kol yüzeyi seçilmiş, seçilen bölgenin temiz ve tüysüz olması, deneklerin ön kol bölgesinde açık yara ve deri hastalığı bulunmaması dikkate alınmıştır. Ayrıca denekler, panel testinin bir hafta öncesinden itibaren kollarının ön yüzüne herhangi bir kozmetik veya topikal farmasötik ürün uygulamamışlardır. Uygulamalar sırasında ön kol yüzeyinde alerjik reaksiyon oluşan deneklerin panel testleri dışında bırakılması öngörülmüştür.

Denekler laboratuvar ortamına ölçümlerin en az 30 dk öncesinde alınmış ve ilk ölçüm normal nem değerinin belirlenmesi için VC uygulanmayan bölgeden alınarak referans değer olarak kabul edilmiştir. Daha sonra VC uygulanmış, uygulamanın 1, 3, 6 ve 24 saat sonrasında ölçüm yapılmıştır. Ölçümlerin öncesinde formülasyonların fazlası deneklerin kollarından kağıt peçete ile uzaklaştırılmıştır. Uygulama günde bir kez (sabah) ve her defasında 2x2 cm'lik bir alana yapılmış, uygulama bölgesindeki 5 noktadan ölçüm alınarak ortalamaları hesaplanmıştır. Ölçümler arasında 5 saniye süre ile beklenerek, Korneometre elektrodundan kaynaklanabilecek oklüzif etkiden kaçınılması

amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek grafik haline getirilmiştir.

### Hasar görmüş deride tamir edici etkinliğin araştırılması

Hasar görmüş deride tamir edici etkinliğin araştırıldığı ikinci panel testinde, 8 kadın ve 2 erkek deneklerin ön kol yüzeyinde belirlenen 2x2 cm'lik 2 bölge, 2.5 dakika boyunca 5 mL aseton ile muamele edilmiştir. Bunun için aseton doldurulmuş plastik tüplerden yararlanılmış, tüpler deneklerin kollarına temas ettirilerek, kolun yavaşça aşağı-yukarı hareket ettirilmesi sağlanmıştır. Sürenin sonunda aseton uygulanan bölgeler kendi kendine kurumaya bırakılmış, tüplerde kalan aseton ise atılmıştır.

Aseton ile muamele edilen bir bölgeye VC uygulanmış, diğer bölge ise karşılaştırma yapılabilmesi açısından aseton muamelesi sonrasında başka işleme tabi tutulmamıştır. Ölçümler 1, 3, 6 ve 24 saat sonunda alınmış, normal nem değerinin belirlenmesi için aseton ile muamele edilmemiş 6. bir bölge de ölçümlere dahil edilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirilerek grafik haline getirilmiştir.

### ATR-FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirilen panel testleri

Korneometre ile gerçekleştirilen panel testlerine ek olarak, VC ile insan derisi arasındaki etkileşimin çalışılması açısından yeni bir yöntem olan ATR-FTIR Spektroskopisi kullanılmıştır. Normal deride ve aseton etkisi ile kurumuş deride ATR-FTIR Spektrometresi ile yapılan analize 23-57 yaş aralığında 3 kadın ve 2 erkek gönüllü bir önceki panel testinde belirtilen koşullar altında katılmışlardır.

İnfrared spektrumu, 4000-400 cm<sup>-1</sup> frekans aralığında, çinko selenürden yapılmış ATR-Kristali taşıyan ATR-FTIR Spektrometresi (Perkin Elmer) ile kaydedilmiştir. Her bir spektrum, 2 cm<sup>-1</sup> lik çözünürlükle elde edilen 80 adet taramanın birleştirilmesi ile oluşmakta ve yaklaşık olarak 5 sn içinde elde edilmektedir. Spektrumlardaki frekans pik konumları, Perkin Elmer Software Utilities bilgisayar programı kullanılarak, ±0.1 cm<sup>-1</sup> hata payı ile belirlenmiştir.

Kolun ön yüzeyinde spektral analiz konusu olacak kısım, ATR kristali üzerine yaslanarak tam temas sağlanmış ve spektrum kayıtları bu şekilde

alınmıştır. Laboratuvar ortamına analiz en az 30 dk öncesinde alınan deneklerde ilk spektrum, derideki test bölgesinin bir kağıt peçete ile temizlenmesinin ardından, VC uygulanmadan kaydedilerek, referans spektrum olarak kabul edilmiştir. ATR kristali her analiz sonrasında etanol ile temizlenmiş, kurulanmış ve etanol tamamen uçuktan sonra boş bir spektrum çekilmiştir.

Spektrum kayıtlarında **CH<sub>2</sub> asimetrik ve simetrik gerilme bantları ile** derinin hidrasyon seviyesi hakkında bilgi veren **Amid 1** (1645 cm<sup>-1</sup>) ve **Amid 2** (1545 cm<sup>-1</sup>) absorpsiyonları incelenmiştir. 1740 cm<sup>-1</sup> de, lipidlerin **C=O gerilme bantından** kaynaklanan ve sebum lipidlerinin göstergesi olan absorpsiyon da araştırma sonuçlarına dahil edilmiştir.

#### Vernix caseosa'ya Ait Bulgular

Tam zamanlı doğmuş bebeklerin sırt ve omuz bölgelerinden toplanan VC örneklerinin gözle yapılan fiziksel kontrolünde sadece bir örnekte kan ile kontaminasyona rastlanmış ve bu örnek deneylerde kullanılmamıştır.

#### Panel Testlerine Ait Bulgular

##### Korneometre ile gerçekleştirilen panel testlerine ait bulgular

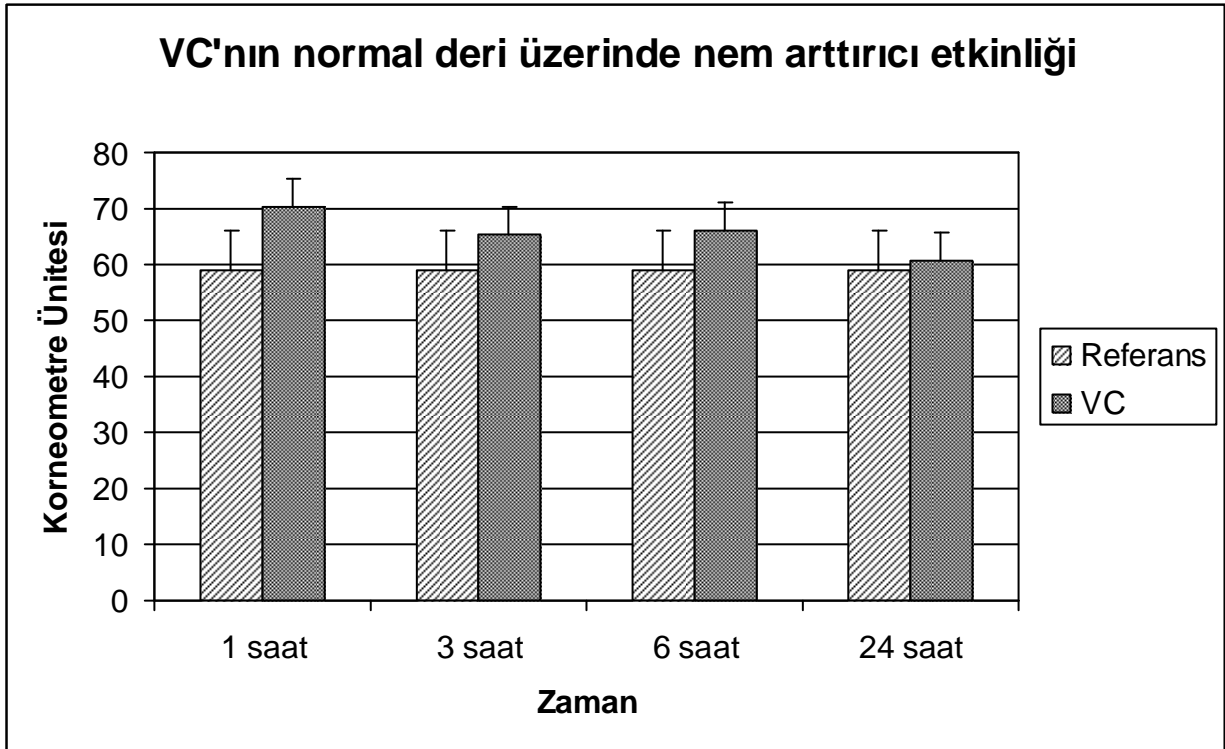
##### *Normal deride nemlendirici etkinliğin araştırılmasına ait bulgular*

12 denek üzerinde 1, 3, 6 ve 24 saat sonunda yapılan ölçümlere ait sonuçlar Şekil 1'de verilmiştir.

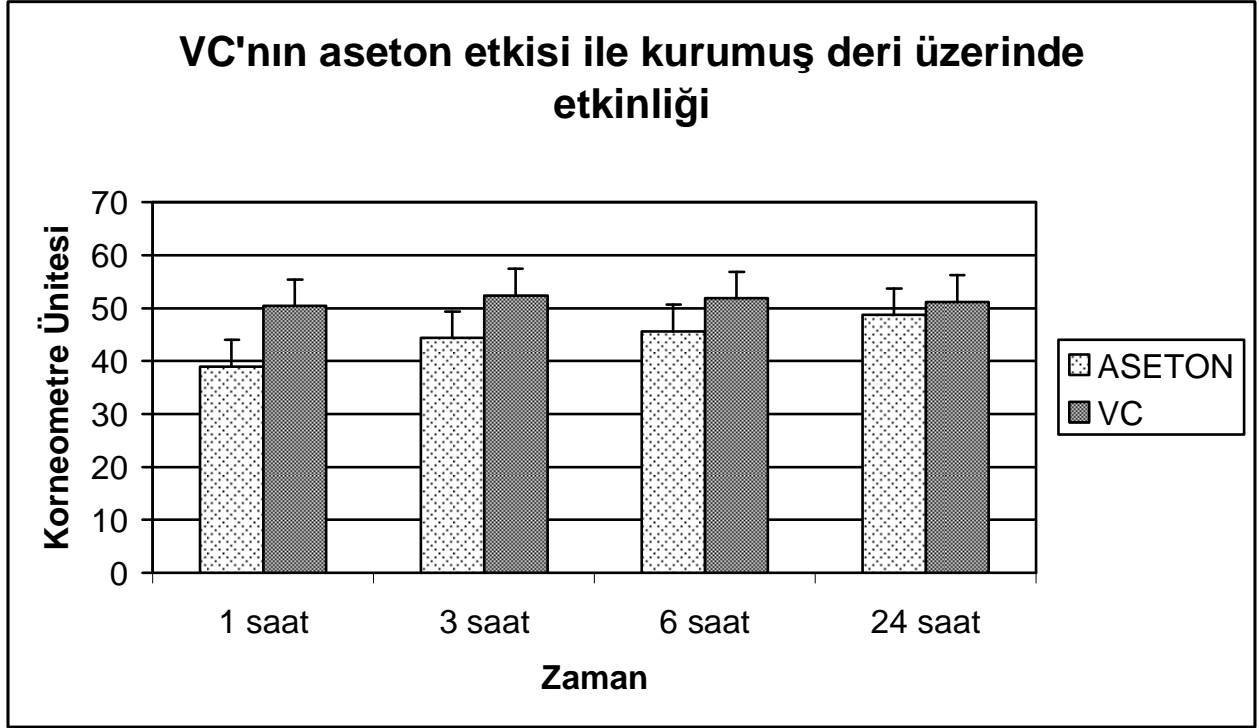
Deneklerde ortalama  $58.51 \pm 1.04$  Korneometre Ünitesi olarak saptanan referans değeri, uygulamaların yapıldığı ön kol bölgesinin düşük ile normal arasında nemli olduğunu göstermiştir. VC'nın nemlendirme değeri ilk 1 saatin sonunda en yüksekken, 3 ve 6 saatlerin sonunda düşmekte ve 24 saat sonunda bazal değerlerle aynı seviyeye inmektedir.

##### *Hasar görmüş deride onarıcı etkinliğin araştırılmasına ait bulgular*

Hasar görmüş deride onarıcı etkinliğin araştırılmasında elde edilen sonuçlar Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 1. VC'nın normal deri üzerinde nem arttırıcı etkinliğinin araştırılmasına ait bulgular.



Şekil 2. VC'nın aseton etkisi ile kurumuş deri üzerinde onarıcı etkinliğinin araştırılmasına ait bulgular.

1. saatin sonunda referans bölgesi ile asetonla muamele edilmiş bölgede ölçülen nem değerleri arasında anlamlı fark bulunmuş ( $P < 0.05$ ) ve deri hidrasyonunda %22 oranında bir azalma saptanmıştır. Ayrıca, derinin fizyolojik tamir mekanizması, hidrasyon seviyesinin eski düzeyine getirilmesinde 24 saat sonunda da yetersiz kalmıştır. İlk 3 saatin sonunda VC, derinin hidrasyon seviyesinin onarımında belirgin etki göstermiştir.

#### *ATR-FTIR spektroskopisi ile gerçekleştirilen panel testlerine ait bulgular*

VC'nın SC hidrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması sırasında spektrum kayıtları alınırken deneklerin ön kol yüzeyi ile ATR kristali arasında tam temas sağlanmıştır. ATR kristalinin etanol ile temizlenmesinin ardından çekilen boş spektrumda etanole ait iz görülmemiştir.

#### *Normal deride nemlendirici etkinliğin ve hasar görmüş deride onarıcı etkinliğin araştırılmasına ait bulgular*

Normal deride nemlendirici etkinliğin ATR-FTIR Spektroskopisi ile araştırılmasında deneklerin ön kol bölgesinden alınan referans değer orta-

laması, asimetric gerilme bantları için,  $2918.64 \pm 1.02 \text{ cm}^{-1}$ , simetric gerilme bantları için  $2850.36 \pm 0.59 \text{ cm}^{-1}$ 'dir. Derinin hidrasyon seviyesindeki değişmelerin izlenmesine yardımcı olan Amid 1 ve Amid 2 absorbanslarının referans değer ortalaması, Amid 1 absorbansı için,  $1645.24 \pm 1.54 \text{ cm}^{-1}$ , Amid 2 absorbansı için  $1542.31 \pm 0.12 \text{ cm}^{-1}$ 'dir.

VC uygulanmasının 3 ve 6 saat sonrasında  $\text{CH}_2$  asimetric ve simetric gerilme bantları ve Amid absorbanslarına ait dalga numaralarında meydana gelen değişimler Tablo 1'de verilmiştir.

$1740 \text{ cm}^{-1}$ 'de, lipitlerin C=O gerilme bandından kaynaklanan ve sebum lipitlerinin göstergesi olan absorbans, referans bölgelerden alınan spektrumlarda görülmemiştir. VC uygulanmasının 3 ve 6 saat sonrasında  $1740.22 \pm 0.57 \text{ cm}^{-1}$ 'de keskin ve belirgin bir pik olarak saptanmıştır.

Aseton ile muamele edilen ön kol bölgesinden alınan referans değerler, asimetric gerilme bantları için,  $2922.91 \pm 1.14 \text{ cm}^{-1}$ , simetric gerilme bantları için  $2854.40 \pm 1.09 \text{ cm}^{-1}$ 'dir. Amid 1 ve Amid 2 absorbanslarının aseton ile muamele edilmiş bölgeden alınan referans değerleri sırası ile  $1649.04 \pm$

**Tablo 1.** VC'nın normal deri üzerinde nemlendirici ve hasar görmüş deri üzerinde tamir edici etkinliğinin ATR-FTIR spektroskopisi ile araştırılmasına ait bulgular.

	Normal Deri		Aseton Etkisi ile Kurumuş Deri	
	3 saat	6 saat	3 saat	6 saat
CH <sub>2</sub> ASGB	2921.78 ± 0.37	2921.02 ± 0.24	2920.78 ± 0.12	2920.90 ± 0.11
CH <sub>2</sub> SGB	2852.04 ± 0.27	2852.39 ± 0.72	2852.04 ± 0.17	2852.47 ± 0.65
Amid 1	1643.56 ± 0.26	1644.01 ± 0.44	1645.23 ± 0.23	1645.30 ± 0.53
Amid 2	1543.81 ± 0.72	1543.30 ± 0.71	1542.81 ± 0.09	1543.04 ± 0.56

**1.04 cm<sup>-1</sup>** ve **1541.02 ± 1.81 cm<sup>-1</sup>**dir. VC uygulanmasının 3 ve 6 saat sonrasında CH<sub>2</sub> asimetrik ve simetrik gerilme bantlarına ve Amid absorbanslarına ait dalga numaralarında meydana gelen değişimler Tablo 1'de verilmiştir.

Aseton ile muamele edilen referans bölgeden alınan spektrumda, lipidlerin C=O gerilme bandından kaynaklanan absorbans (1740 cm<sup>-1</sup>) görülmüştür. VC uygulanmasının 3 saat sonrasında bütün deneklerde 1740.01 ± 1.12 cm<sup>-1</sup>'de saptanmıştır.

### Tartışma

Erken doğumlarda karşılaşılan önemli bir problem, deri yüzeyinde VC'nın eksikliği ve derinin engel işlevinin tam gelişmemiş olmasıdır. Bu durum erken doğan bebeklerde enfeksiyona yatkınlık, deri üzerinden yüksek oranda su kaybı ve vücut sıcaklığının kontrolünün zorlaşması gibi problemlere yol açmaktadır. Oysa, tam zamanlı doğmuş bebeklerde, deri yüzeyinde bulunan VC üzerinden gerçekleşen kontrollü su kaybı, SC engel işlevinin gelişimine yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, tam zamanlı doğan bebeklerde, VC'nın deri üzerinde belli bir süre bırakılması tavsiye edilmektedir. Erken doğumlarda ise bebeklere, çoğunlukla deri üzerinde engel oluşturan yağlar veya yağ ağırlıklı topikal ürünler sürülmekte ve deri üzerinden gerçekleşen su kaybı bu şekilde önlenmeye çalışılmaktadır. Ancak VC'yı, özellikle yüksek su içeriği ve deriyi nemlendirme etkileri konusunda daha iyi taklit edebilecek yeni formülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>1,3</sup>

Çalışmamızda, VC'nın SC hidrasyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması amacı ile panel testleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar değerlendiril-

miştir. Panel testlerinde ilk olarak Korneometre ile elektriksel kapasitenin ölçülmesi yöntemi kullanılmıştır. VC'nın nemlendirici etkinliği ilk bir saatin sonunda en yüksek bulunmuş, 3 ve 6 saatlerin sonunda düştüğü ve 24 saat sonunda bazal değerlerle aynı seviyeye indiği görülmüştür.

Hasar görmüş deride tamir edici etkinliğin araştırıldığı ikinci panel testinde, 1. saatin sonunda referans bölgesi ile asetonla muamele edilmiş bölgede ölçülen nem değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur (P< 0.05). 24 saat sonunda derinin fizyolojik tamir mekanizmasının hidrasyon seviyesini eski düzeyine getiremediği görülmüştür. Bu bulgular literatürle uyumludur.<sup>13</sup> VC ilk üç saatin sonunda, derinin hidrasyon seviyesinin oranında çok belirgin bir etki göstermiştir. VC uygulanan bölge ile sadece asetonla muamele edilen bölgeden alınan nem değerleri 1, 3 ve 6. saatlerin sonunda anlamlı derecede farklı bulunmuştur (P< 0.05).

ATR-FTIR Spektroskopisi yöntemi ile 5 gözümlü denek üzerinde gerçekleştirilen testlerde, CH<sub>2</sub> asimetrik ve simetrik gerilme bantlarının yanı sıra, derinin hidrasyon seviyesi hakkında bilgi veren Amid 1 (1645 cm<sup>-1</sup>) ve Amid 2 (1545 cm<sup>-1</sup>) absorbansları incelenmiştir. 1740 cm<sup>-1</sup>'de, lipidlerin C=O gerilme bandından kaynaklanan ve sebum lipidlerinin göstergesi olan absorbans da araştırma sonuçlarına dahil edilmiştir.

Normal deride nemlendirici etkinliğin araştırılmasında, deneklerin ön kol bölgesinden alınan referans değerler SC hücrelerarası lipidlerinin belli bir yapısal düzen içinde bulduklarını göstermektedir. VC uygulanması, 3 saat sonunda CH<sub>2</sub> asimetrik ve simetrik gerilme bantlarının daha yüksek

dalga numaralarında saptanmasına neden olmuştur. Bu durum, SC hücrelerarası lipitlerinin alkil zincirlerinde düzensizliğin artmasına bağlanabilir. VC'nın SC lipitleri ile karışarak lipit ortamın akışkanlığını değiştirdiği düşünülmektedir. Bir başka açıklama ise VC lipitlerinin SC'da birikerek daha sıvı bölgeler oluşturmaları, bu şekilde de bütün lipit ortamın faz davranışının değişmiş gibi görünmesidir. Bu etki 6 saat sonunda da değişmeden devam etmiştir.

1740  $\text{cm}^{-1}$  de, lipitlerin C=O gerilme bandından kaynaklanan ve sebum lipitlerinin göstergesi olan absorbands, referans bölgelerden alınan spektrumlarda saptanmamıştır. Bu durum ön kol bölgesinde yağ bezlerinin sayısının, vücudun diğer kısımlarına oranla daha az olmasına bağlanabilir. *In vivo* koşullarda, SC'un hidrasyon, lipit bileşimi ve alkil zincirlerinin yapısal düzeni gibi biyofiziksel parametrelerinin anatomik bölgeye bağlı oldukları bulunmuştur.<sup>20</sup> C=O gerilme bandına ait absorbands, VC uygulanması ile 3 ve 6 saat sonunda ortaya çıkmıştır.

Amid 1 ve Amid 2 absorbandslarının spektral konumlarındaki değişmelerin, incelenen örneklerin hidrasyonundaki değişmelere bağlı olduğu bildirilmiştir.<sup>23</sup> VC uygulandıktan 3 ve 6 saat sonra, Amid 1 absorbandsının referans bölgeden alınan ölçüme göre daha düşük dalga numarasına, Amid 2 absorbandsının ise daha yüksek dalga numarasına geçiş yapması derinin hidrasyonundaki artışın bir göstergesidir. Bu bulgu literatür ile uyumludur.<sup>21,23</sup>

Hasar görmüş deride tamir edici etkinliğin ATR-FTIR spektroskopisi ile araştırılmasında, aseton uygulanan bölgelerde kuru bir görüntü oluşmuştur. Ayrıca, aseton ile muamele edilen ön kol bölgesinden alınan referans değerler normal deride ölçülen referans değerler ile karşılaştırıldığında, asimetric ve simetric gerilme bantları daha yüksek dalga numaralarında saptanmıştır. Bu durum deri lipitlerinin, dolayısı ile de derinin engel işlevinin aseton muamelesi sonucunda hasar gördüğünün bir işareti olarak kabul edilebilir. Hasar görmüş deride VC uygulanmasının 3 saat sonrasında  $\text{CH}_2$  asimetric ve simetric gerilme bantlarına ait dalga numaralarında yaklaşık 2  $\text{cm}^{-1}$  kadar düşüş kaydedilmiştir.

SC örneklerinde, dehidrasyon işlemi sonucunda Amid 1 bandının daha yüksek, Amid 2 ban-

dının ise daha düşük dalga numaralarında saptandığı bildirilmiştir.<sup>23</sup> Çalışmamızda, aseton ile muamele edilmiş bölgeden alınan Amid 1 ve Amid 2 absorbandslarına ait referans değerlerin bu bulguya uygunluk göstermesi, asetonun deri üzerindeki kurutucu etkisinin bir sonucu olarak yorumlanmıştır. VC uygulanmasının 3 saat sonrasında Amid 1 absorbandsında 4  $\text{cm}^{-1}$  düşüş, Amid 2 absorbandsında 1  $\text{cm}^{-1}$  artışa neden olmuştur. Bu durum da derinin hidrasyon seviyesinin arttığını gösteren bir işaret olarak kabul edilmiştir. 6 saat sonunda ise Amid absorbandslarına ait değerler normal seviyelerde kalmıştır.

Çalışmamızda, VC'nın normal ve hasar görmüş deri üzerindeki olumlu etkileri Korneometre ve ATR-FTIR Spektroskopisi deneyleri ile doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular, deriyi koruma görevi doğum sonrasında da devam eden ve yeni doğan bebeğin vücudunun, dış çevre ile uyum sağlamasına yardımcı olan VC'nın eksikliğinde, alternatif olarak kullanılabilir topikal bir formülasyon geliştirilmesinde yol gösterecektir. Geliştirilen formülasyonun, yetişkinlerde kuru deri belirtisi ile birlikte seyreden deri hastalıklarında da deri hidrasyonunu arttırması ve bunun yanı sıra derinin engel işlevini güçlendirme ve korumaya yönelik olarak kullanılabilmesi de söz konusu olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Pickens WL, Warner RR, Boissy YL, Boissy RE, Hoath SB. Characterization of vernix caseosa: water content, morphology and elemental analysis. *J Inv Dermatol* 2000;115:875-81.
2. Hoeger PH, Schreiner V, Klaassen IA, Enzmann CC, Friedrichs K, Bleck O. Epidermal barrier lipids in human vernix caseosa: corresponding ceramide pattern in vernix and fetal skin. *Brit J Dermatol* 2002;146:194-201.
3. Bautista MIB, Wickett RR, Visscher MO, Pickens WL, Hoath SB. Characterization of vernix caseosa as a natural biofilm: Comparison to standard oil-based ointments. *Pediatric Dermatol* 2000;17:253-60.
4. Hoath SB, Narendran V, Visscher MO. The biology and role of vernix. *Neonatal and Infant Rew* 2001;1:53-8.
5. Bodak N, Bodemer C. Cutaneous hydration of the premature and new born. *Ann Dermatol Venereol* 2002;129:143-6.
6. Haubrich KA. Role of vernix caseosa in the neonate, potential application in the adult population. *AACN Clinical Issues* 2003;14:457-64.
7. Gunt HB. Water handling properties of vernix caseosa. Master of Science Thesis in the Division of Pharmaceutical Sciences of the College of Pharmacy. Division of Research and Advanced Studies of the University of Cincinnati, 2002.



8. McGrath JA, Eady RAJ, Poeppe FM. Anatomy and Organization of Human Skin. Rook's Textbook of Dermatology, 7<sup>th</sup> Edition. Ed. T Burns, S Breathnach, N Cox, C Griffiths. Blackwell Publishing, USA, 2004;3:1-15.
9. Schaefer H, Redelmeier TE. Skin Barrier, Principles of Percutaneous Absorption, Karger, Switzerland 1996.
10. Loden M. Skin barrier function: Effects of moisturizers. *Cosm Toilet* 2001;116:31-40.
11. Loden M. The skin barrier and use of moisturizers in atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 2003;21:145-57.
12. Paepe K, Derde MP, Roseeuw D, Rogiers V. Claim substantiation and efficiency of hydrating body lotions and protective creams. *Contact Dermatitis* 2000;42:227-34.
13. Paepe K, Roseeuw D, Rogiers V. Repair of acetone and sodium lauryl sulphate damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. *JEADV* 2002;16:587-94.
14. Loden M, Andersson AC, Lindberg M. Improvement in skin barrier function in patients with atopic dermatitis after treatment with a moisturizing cream (Canoderm). *Bri J Dermatol* 1999;140:264-7.
15. Loden M, Barany E. Skin-identical lipids versus petrolatum in the treatment of tape stripped and detergent-perturbed human skin. *Acta Derm Venereol* 2000;80:412-5.
16. Lambers H, Pronk H. Biophysical methods for stratum corneum characterization. *Cosmetic Lipids and the Skin Barrier*. Ed. Thomas Förster. Marcel Dekker Inc. NY 2002;185-225. XZ.
17. Prash T, Förster T. "Detection of Cosmetic Changes in Skin Surface Lipids by Infrared and Raman Spectroscopy", *Cosmetic Lipids and the Skin Barrier*, Ed. Thomas Förster, Marcel Dekker Inc, NY, 2002.
18. Markovich RJ, Pidgeon C. Introduction to Fourier transform infrared spectroscopy and applications in the pharmaceutical sciences. *Pharm Res* 1991;8:663-75.
19. Moore DJ, Rerek ME, Mendelsohn R. Lipid domains and orthorhombic phases in model stratum corneum: evidence from FTIR spectroscopy studies. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:797-801.
20. Moore DJ, Rerek ME. Insights into the molecular organization of lipids in the skin barrier from infrared spectroscopy studies of stratum corneum lipid models. *Acta Derm Venereol Suppl* 2000;208:16-22.
21. Alberti I, Kalia YN, Naik A, Bonny JD, Guy RH. Effect of ethanol and isopropyl myristat on the availability of topical terbinafine in human stratum corneum in vivo. *Int J Pharm* 2001;219:11-9.
22. Brancalion L, Bamberg MP, Skamaki T, Kollias N. Attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy as a possible method to investigate biophysical parameters of stratum corneum in vivo. *J Inv Dermatol* 2001;3:380-6.
23. Bommannan D, Potts RO, Guy RH. Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy. *J Inv Dermatol* 1990;95:403-8.