

Hücre Proliferasyonu Etki Test Raporu

Kayıt/Rapor No	2025.05.013
Rapor Tarihi	15.05.2025
Test Başlangıç-Bitiş Tarihi	04.05.2025-08.05.2025
Talepte Bulunan Firma/ Kişi	Akra Group Kozmetik ve İlaç San. Tic. A.Ş.
Talepte Bulunan Firma Adresi	Yakuplu Mh. 228. Sk. No:18 İç Kapı: 3 Beylikdüzü/İstanbul
Ürün Adı	Duaderm Barrier Cream
İstenen Testler	Hücre Proliferasyonu Testi
Sonuç Yorum	Test materyali proliferatif (hücre yenileme) etkiye sahiptir.
Ek	Test Raporu

Raporu Onaylayan

Dr. OĞUZ ÖZTÜRK



Kayıt/Rapor No 2025.05.013

Raporda yer alan bulgular ve sonuçlar test edilen materyale aittir, Bu rapor 4 sayfa olup, 2 asıl olarak (1 asıl müşteriye, 1 asıl kurum arşivine) hazırlanmıştır.

Morlab Biyoteknoloji San. Tic Ltd. Şti. Akdeni Üniv. Antalya Teknokenti. Uluğbey Ar-Ge 2 3A/B36 ANTALYA mail@morlab.com.tr

Hücre Proliferasyonu Etki Test Raporu

1.	Test materyali Bilgileri
2.	Testi Bilgileri
3.	Testi Sonucu

1	Test Materyali Bilgileri (TM): Duaderm Barrier Cream Lot Number: 1235-01						
2	Test bilgisi Proliferasyon testi, hücrelerdeki DNA' ya BrdU (5-bromodeoksiüridin) bağlanmasının saptanması ile ölçülen bir test yöntemidir (ROCHE, 2012). Prolifiye olan hücrelerin DNA' sındaki timidinle BrdU yer değiştirmektedir. S fazındaki hücrelerin BrdU ile işaretlenmesi ve bu işaretli hücre grubunun hücre siklusundaki ilerlemesinin izlenmesine dayanmaktadır. Hücre Kültürü şartları Çalışma kapsamındaki tüm deneylerde ATCC'den temin edilen İnsan deri fibroblast hücre hattı HS68 (ATCC CRL-1635) kullanıldı. Hücreler, %10 FBS ve %2 glutamin ile desteklenmiş DMEM (ATCC Kat No:30-2006) besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO ₂ 'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin önerdiği şekilde hücrelerin tripsinasyonu için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanıldı. Test materyalinin hücre çoğalması üzerindeki etkilerini incelemek için doz taraması yapıldı. HS68 hücreleri 5x10 ³ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara bölündü ve yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyerleri çekilerek her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlarda test materyali 100 µl/kuyucuk olacak şekilde uygulandı. 72 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Süre sonunda, anti-BrdU- peroksidadz antikoru eklendikten sonra oluşan immün kompleksler spektrofotometrede 370 nm de ölçülerek değerlendirildi. Test Ürünü Özüt Hazırlama Protokolü <table><tr><td>Negatif Kontrol (NK): DMEM</td><td>Negatif kontrol olarak, hücre kuyucuklarına sadece DMEM içeren besiyeri kullanıldı .</td></tr><tr><td>Pozitif Kontrol (NK): Ellagik Asit</td><td>2mg alınan ellagik asit 302.192 g/mol moleküler ağırlığa sahip olup 1324 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülmüştür.Stok çözelti 100 µM olacak şekilde DMEM ile seyreltildi. Pozitif Kontrol grubu olarak uygulandı</td></tr><tr><td>Test Materyali Özüt Hazırlama</td><td>Test materyali 0,1gr/ ml olarak içerisinde bulunan DMEM besiyerinde çözüldü. 24 saat 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 120 rpm ile inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 0,22 µm membran filtreden geçirilerek test konsantrasyonlarında kullanıldı. ISO 10993-12 test standartına göre özütleme yapılmıştır. Test Materyali Uygulama dozları (w/v): 100 ve 200 µg/ml</td></tr></table>	Negatif Kontrol (NK): DMEM	Negatif kontrol olarak, hücre kuyucuklarına sadece DMEM içeren besiyeri kullanıldı .	Pozitif Kontrol (NK): Ellagik Asit	2mg alınan ellagik asit 302.192 g/mol moleküler ağırlığa sahip olup 1324 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülmüştür.Stok çözelti 100 µM olacak şekilde DMEM ile seyreltildi. Pozitif Kontrol grubu olarak uygulandı	Test Materyali Özüt Hazırlama	Test materyali 0,1gr/ ml olarak içerisinde bulunan DMEM besiyerinde çözüldü. 24 saat 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 120 rpm ile inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 0,22 µm membran filtreden geçirilerek test konsantrasyonlarında kullanıldı. ISO 10993-12 test standartına göre özütleme yapılmıştır. Test Materyali Uygulama dozları (w/v): 100 ve 200 µg/ml
Negatif Kontrol (NK): DMEM	Negatif kontrol olarak, hücre kuyucuklarına sadece DMEM içeren besiyeri kullanıldı .						
Pozitif Kontrol (NK): Ellagik Asit	2mg alınan ellagik asit 302.192 g/mol moleküler ağırlığa sahip olup 1324 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülmüştür.Stok çözelti 100 µM olacak şekilde DMEM ile seyreltildi. Pozitif Kontrol grubu olarak uygulandı						
Test Materyali Özüt Hazırlama	Test materyali 0,1gr/ ml olarak içerisinde bulunan DMEM besiyerinde çözüldü. 24 saat 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 120 rpm ile inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda 0,22 µm membran filtreden geçirilerek test konsantrasyonlarında kullanıldı. ISO 10993-12 test standartına göre özütleme yapılmıştır. Test Materyali Uygulama dozları (w/v): 100 ve 200 µg/ml						

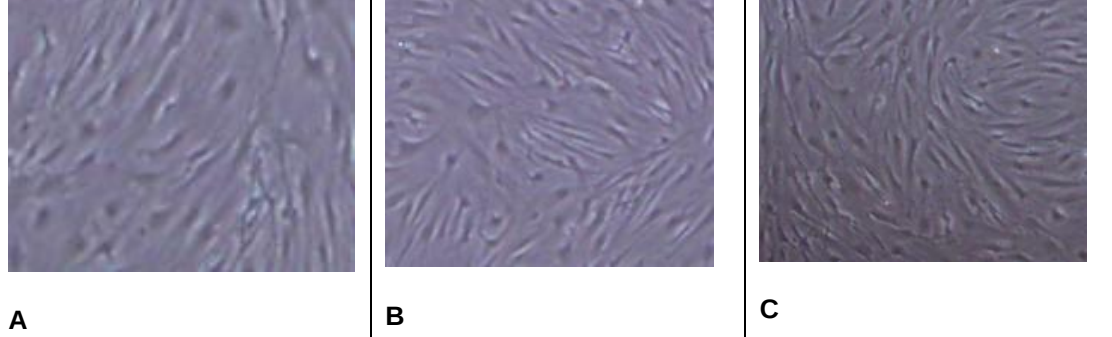
Kayıt/Rapor No 2025.05.013

Raporda yer alan bulgular ve sonuçlar test edilen materyale aittir, Bu rapor 4 sayfa olup, 2 asıl olarak (1 asıl müşteriye, 1 asıl kurum arşivine) hazırlanmıştır.

Morlab Biyoteknoloji San. Tic Ltd. Şti. Akdeni Üniv. Antalya Teknokenti. Uluğbey Ar-Ge 2 3A/B36 ANTALYA mail@morlab.com.tr

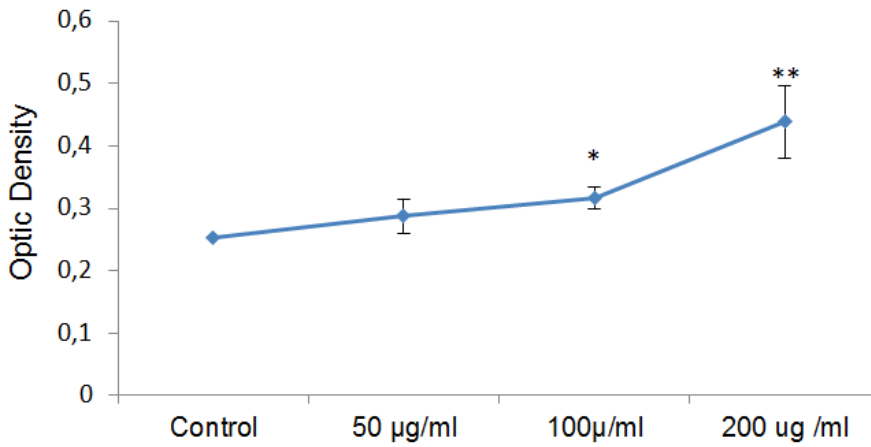
Mikroskopik Görüntüleme

Şekil 1. A. Negatif Kontrol B. Pozitif Kontrol C. Test materyalinin 200 µg/ml konsantrasyonunun mikroskopik görüntüleri



3 Test Sonucu

Roche marka Cell Proliferation Elisa BrdU (kolorimetrik) Version 16 kiti ile ölçümler her bir konsantrasyon 5 kez tekrar edilerek yapıldı. Deneyler 5 tekrar olarak yapılmış olup sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analiz SPSS Versiyon 23 bilgisayar programı ile gerçekleştirildi. Negatif kontrolün diğer gruplar arasındaki farklılıkları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gruplar arasında farklılıklar ise POST HOC analizi ile ölçümlendirildi. 0,01'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 2. Test materyalinin proliferatif özelliğinin optik yoğunluk ölçümleri grafiği

Tablo 1. Test materyalinin hücre çoğalması üzerindeki etkisinin gösterilmesi.

Kontrol	Optic Density- Optik Yoğunluk (Absorbans Ölçümleri) (OD)		
	50µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
0,25±0,009	0,28±0,027	0,317±0,017*	0,43±0,058**

Test sonucunda Duaderm Bariyer Krem 100 ve 200 µg/ml uygulaması ile kontrol grubuna göre proliferatif etkinin (hücre yenilenmesi) arttığı görülmüştür. Bu sonuçlara göre Duaderm Bariyer Krem proliferatif etkili bir üründür. Hücre yenileme özelliği vardır.

ONAY. 15.05.2025

DR. OĞUZ ÖZTÜRK**Kaynaklar**

Onuma H., et al., Quantitative analysis of the proliferation of epidermal cells using a human skin organ culture system and the effect of DbcAMP using markers of proliferation (BrdU, Ki-67, PCNA) Arch Dermatol Res. 2001;293:133–138.

Rattan SI, et al., . Hormesisbased anti-aging products: a case study of a novel cosmetic. Dose-Response. 2013; 11: 99-108.

Soydas T, et al., The protective effects of metformin in an in vitro model of aging 3T3 fibroblast under the high glucose conditions. J Physiol Biochem. 2018 May;74(2):273-281