

**In Vitro Cilt Antiaging (Yaşlanma Karşıtı) Etki
Test Raporu**

Kayıt/Rapor No	2025.05.15
Rapor Tarihi	15.05.2025
Test Başlangıç-Bitiş Tarihi	08.05.2025 – 14.05.2025
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	Kırışıklık Karşıtı
Sonuç Yorum	Test Ürünü Kırışıklık karşıtı bir üründür.
Ek	Test Raporu

Raporu Onaylayan

Dr. OĞUZ ÖZTÜRK



Kayıt/Rapor No 2025.05.15

Raporda yer alan bulgular ve sonuçlar test edilen materyale aittir, Bu rapor 5 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

**In Vitro Cilt Antiaging (yaşlanma karşıtı) 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 Tip I kollajen, omurgalıların tümünde bulunan en bol proteindir. Tendonlarda, kıkırdakta, kemiklerin organik matriksinde ve gözün korneasında önemli miktarlarda bulunan basit ve fibriler yapıda skleroproteindir. Kollajen başlıca fibroblastlar, miyofibroblastlar, osteoblast ve kondrositler tarafından sentezlenmektedir (Ganceviciene et al., 2012) Yaşla beraber kollajen I miktarında meydana gelen azalmalara karşı kullanılan anti-aging kremler, kollajen I miktarını artırabilir. Bu amaçla test te kollajen I miktarları ölçülmüştür (Kramer et al., 2001). 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 [Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC Kat No: 30-2006)] besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO₂'li etüvde 37°C'de inkübe edildi. ATCC'nin önerdiği şekilde hücrelerin tripsinazyonu için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanıldı. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara her kuyucuk başına 2x10⁵ hücre olacak şekilde bölündü. HS68 hücrelerinden besiyerin salınan Kollajen αI (Col I) miktarları, 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda Human Kollajen αI ELISA Kit kullanılarak belirlenmiştir. Deneye başlamadan önce her bir kuyucuk dört kez 300 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Belirlenen dozlarda test materyali uygulaması yapılan deney gruplarından ve kontrol grubundan 50'şer µL alınarak bu kuyucuklara eklendi. İki saat oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Her bir kuyucuk dört kez 300 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 100 µL İnsan Col I antikoru üzerlerine ilave edildi. Bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuk dört kez 300 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 µL Avidin-HRP A (Avidin Peroksidaz A) solüsyonu eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübe edildi. Her bir kuyucuk beş kez 300 µL 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 µL Substrat F (yüksek hassasiyetli TMB) solüsyonunun eklenerek 10 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklara bağlanan Col I'in miktarına bağlı olarak mavi renk oluşumu gözlemlendi. Her kuyucuğa 100 µL durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve renk maviden sarıya döndü. Örneklerle ait absorbans değerleri Eliza kit okuyucuda (Thermo Fisher, Multi Scan FC Microplate Reader) 450 nm'de okundu.

Kayıt/Rapor No 2025.05.15

Raporda yer alan bulgular ve sonuçlar test edilen materyale aittir, Bu rapor 5 sayfa olup, 2 asıl olarak (1 asıl müşteriye, 1 asıl kurum arşivine) hazırlanmıştır.

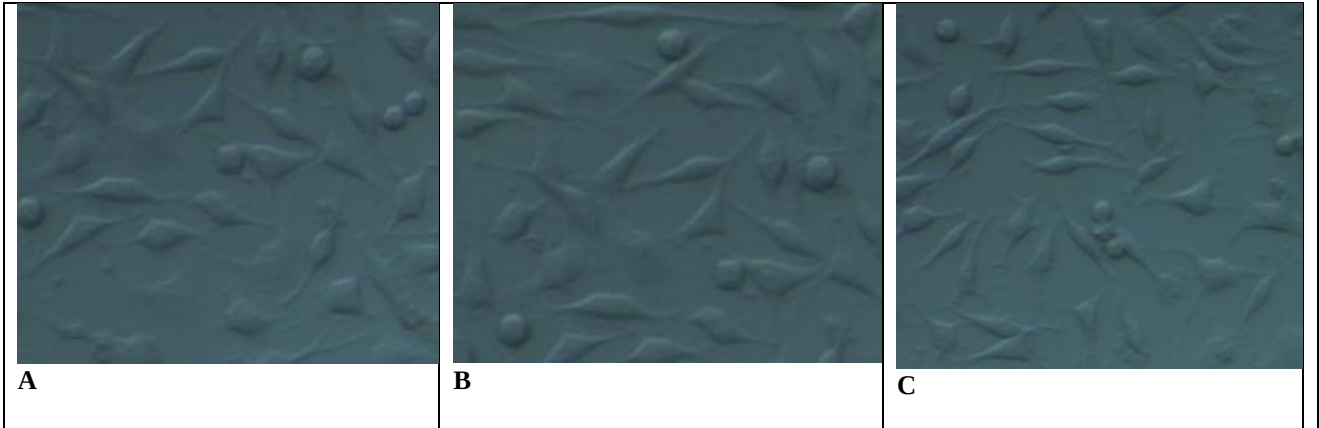
Morlab Biyoteknoloji San. Tic Ltd. Şti. Akdeni Üniv. Antalya Teknokenti. Uluğbey Ar-Ge 2 3A/B36 ANTALYA mail@morlab.com.tr

Test Ürünü Özüt Hazırlama Protokolü

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 çözümüştür.Stok çözelti 100µM olacak şekilde DMEM ile seyreltilti. 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 özütlenme yapılmıştır. Test Materyali Uygulama dozları (w/v): 100 ve 200 µg/ml

Mikroskopik Görüntüleme

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

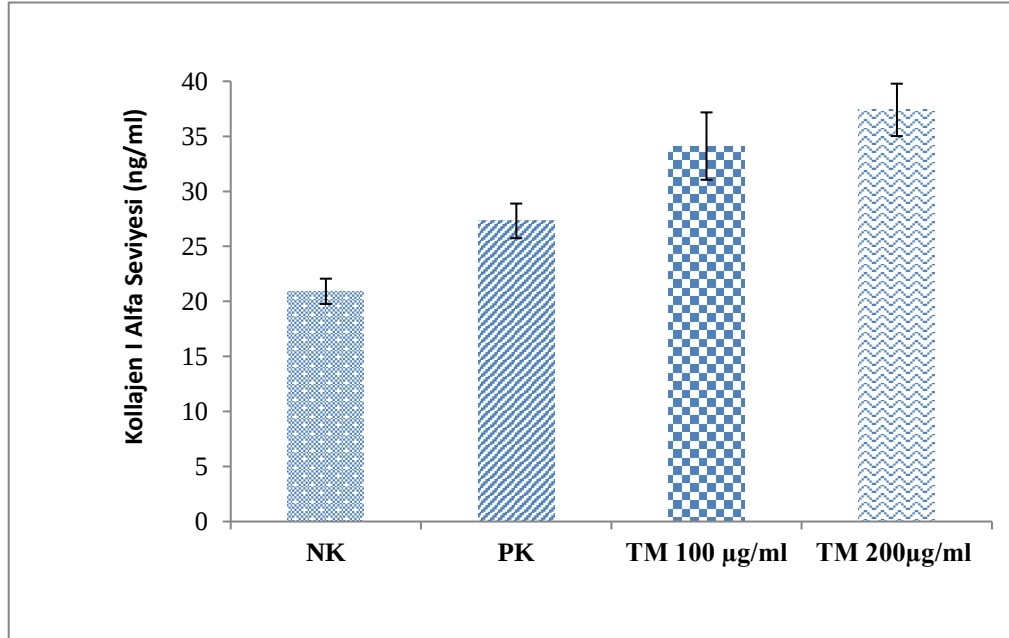


- 3 Anti Aging Test Sonucu (Kırışıklık Karşıtı)**
Deneyler 5 tekrar olarak yapılmış olup sonuçlar, ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. İstatistiksel analiz SPSS Versiyon 23 bilgisayar programı ile gerçekleştirildi. Negatif kontrolün diğer gruplar arasındaki farklılıkları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile gruplar arasında farklılıklar ise POST HOC analizi ile ölçümlendirildi. 0,01'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 1. Test materyalinin Kollajen tip I alfa düzeyleri üzerindeki etkisinin gösterilmesi [n.s (non-significant-anlamsız) *p<0.01].

<i>Kollajen 1A düzeyi (ng/ ml) ± SS (Standart Sapma)</i>				
<i>N=5</i>	<i>NK</i>	<i>PK</i>	<i>TM 100 µg/ml</i>	<i>TM 200 µg/ml</i>
1	22,16	27,16	34,12	36,25
2	21,45	26,45	38,36	34,16
3	20,29	25,29	30,25	37,6
4	19,25	29,25	32,42	40,5
5	21,44	28,44	35,41	38,5
Ortalama±SS	20,91±1,14	27,32±1,57*	34,11±3,06^{n.s}	37,40±2,38*

Şekil 1. Kollajen tip I alfa seviyeleri grafikte gösterilmiştir. (p<0.01)



Test sonucunda DUADERM BARRIER CREAM ürününün 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonlarında kollajen tip I alfa seviyelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış olduğu belirlendi. Pozitif kontrole göre 100 ve 200 µg/ml konsantrasyonda istatistiksel olarak fark vardır. Bu sonuçlara göre Test Malzemesi etkili bir kırışıklık karşıtı üründür.

ONAY. 15.05.2025

DR. OĞUZ ÖZTÜRK



Kaynaklar

- Dorjsembe B, Lee HJ, Kim M, Dulamjav B, Jigjid T, Nho CW., 2017.** Achillea asiatica extract and its active compounds induce cutaneous wound healing. *J Ethnopharmacol.* 12;206:306-314.
- Ganceviciene, R., Liakou, A.I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E. and Zouboulis C.C., 2012,** Skin anti-aging strategies, *Dermatoendocrinol.* 4(3), 308-19p.
- Hseu YC, Korivi M, Lin FY, Li ML, Lin RW, Wu JJ, Yang HL., 2018.** Trans-cinnamic acid attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of AP-1 activation and induction of Nrf2-mediated antioxidant genes in human skin fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 90(2):123-134.
- Kramer, R. Z., Bella, J., Brodsky, B. and Berman, H. M., 2001,** The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence, *J Mol Biol.* 311 (1), 131-147p.
- Lee K, Kim HJ, Kim SA, Park SD, Shim JJ, Lee JL., 2021.** Exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* HY7714 Protects against Skin Aging through Skin-Gut Axis Communication. *Molecules.* 16;26(6):1651.
- Vafa BR , Vahid RA , Seyed HR., 2018.** Ellagic acid reveals promising anti-aging effects against D-galactose-induced aging on human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y: A mechanistic study. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 108(5):1712-1724.
- Rebeca R, Manual RF., et al., 2023.** Effect of Punicagin and Ellagic Acid on Human Fibroblasts In Vitro: A Preliminary Evaluation of Their Therapeutic Potential. *Nutrients.* 20 (16).1