

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPOPİGMENTASYON PROBLEMİNE YÖNELİK TOPIKAL
NANOEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE İN
VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

BURCU ÖZKAN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. RABİA ÇAKIR KOÇ**

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOPİGMENTASYON PROBLEMİNE YÖNELİK TOPİKAL
NANOEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE İN
VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Burcu ÖZKAN tarafından hazırlanan tez çalışması 30.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Fatma Gülgün YENER
İstanbul Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, tezimin yürütülmesinde gerekli olanakları sağlayan ve bana her konuda destek olan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ'a,

Tez çalışmalarım süresince katkı sağlayan, engin tecrübe ve ilminden yararlandığım çok değerli hocam Arş. Gör. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ'a,

Tez çalışmalarımın sürdürülmesi sırasında laboratuvar imkanlarını kullanmama olanak sağlayan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gülgün Yener'e ve bünyesindeki Unipharma Kozmetik Araştırma Geliştirme Eğitim ve Danışmanlık Sanayi Ticaret Limited Şirketi'ne

Tez çalışmalarım ve yaşamım boyunca her konuda sürekli yanımda olan, desteğini ve emeğini esirgemeyen, varlığıyla hayatıma anlam katan canım ablam Arş. Gör. Dr. Ebru ALTUNTAŞ'a,

Yüksek lisans öğrenimime başladığım günden beri bana destek olan bütün çalışma arkadaşlarıma,

Tüm yaşamım boyunca hiçbir fedakarlığı ve sevgiyi benden esirgemeyen, maddi manevi desteklerini hep hissettiğim, bana her konuda olduğu gibi bilimsel kariyerimde de her zaman güvenen canım anneme ve babama, her zaman varlığıyla bana mutluluk katan canım anneannem Güldane TAVLI'ya varlığıyla yaşamıma neşe katan canım yeğenim Arif ALTUNTAŞ'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Kasım, 2016

Burcu ÖZKAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	x
KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ABSTRACT.....	xix
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Nanoemülsiyonlar	4
2.1.1 Nanoemülsiyonların Avantajları.....	5
2.1.2 Nanoemülsiyonların Dezavantajları	6
2.1.3 Nanoemülsiyonların Oluşum Mekanizması	7
2.1.4 Nanoemülsiyon Hazırlama Metodları	7
2.1.4.1 Yüksek Enerjili Metodlar	8
2.1.4.2 Düşük Enerjili Metodlar.....	13
2.1.5 Nanoemülsiyonların Karakterizasyonu.....	17
2.1.5.1 Nanoemülsiyonların Morfolojisi	17
2.1.5.2 Damlacık Boyutu, Polidispersite ve Zeta Potansiyel	17
2.1.5.3 Viskozite Tespiti	18
2.1.5.4 İn Vitro Deri Permeasyon Çalışmaları	19
2.1.6 Nanoemülsiyonların Stabilitesi	20
2.1.7 Nanoemülsiyonların Kullanım Alanları	21
2.1.7.1 Nanoemülsiyonların Kozmetikte Kullanımı	21
2.1.7.2 Nanoemülsiyonların Antimikrobiyal Olarak Kullanımı.....	22
2.1.7.3 Nanoemülsiyonların Biyoterörizm Saldırılarındaki Profilaktik Olarak Kullanımı	23

2.1.7.4	Nanoemülsiyonların Mukozal Aşı Olarak Kullanımı	23
2.1.7.5	Nanoemülsiyonların Hücre Kültürü Teknolojisinde Kullanımı	24
2.1.7.6	İlaç Hedeflendirmede Nanoemülsiyonların Kullanımı	25
2.1.7.7	Nanoemülsiyonların İntranazal Yoldan Kullanımları	25
2.1.7.8	Nanoemülsiyonların Parenteral Yoldan Kullanımları	26
2.1.7.9	Nanoemülsiyonların Transdermal Yoldan Kullanımları	26
2.1.7.10	Nanoemülsiyonların Pulmoner Yoldan Kullanımları	27
2.2	Deri ve Yapısı	28
2.2.1	Derinin Fonksiyonları	30
2.2.2	Derinin Fizyolojisi	30
2.2.2.1	Epidermis	30
2.2.2.2	Dermis	36
2.2.2.3	Hipodermis	37
2.3	Cilt Pigmentasyonu	37
2.3.1	Epidermal Melanin Ünitesi	38
2.3.2	Melanogenez	39
2.3.3	Melanin Pigmentasyonunu Etkileyen Faktörler	43
2.3.3.1	Enzim Üzerindeki Etkisi	43
2.3.3.2	Melanositlerin Aktivitesi Üzerindeki Etkisi	44
2.3.4	Pigmentasyon Bozuklukları	45
2.3.4.1	Hipopigmentasyon	49
2.3.5	Piperin	52
2.3.5.1	Piperinin Fizikokimyasal Özellikleri	53
2.3.5.2	Piperinin Biyolojik Aktiviteleri	54
2.3.5.3	Piperinin Pigmentasyon Üzerine Etkisi	57
BÖLÜM 3		
MATERYAL VE METOT		60
3.1	Deneylerde Kullanılan Malzemeler ve Ekipmanlar	60
3.1.1	Kullanılan Kimyasallar	60
3.1.2	Kullanılan Cihazlar	61
3.2	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	62
3.2.1	Tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Tamponu	62
3.2.2	Sodyum Fosfat Tamponu	62
3.3	DeneySEL Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	63
3.3.1	Zeta Potansiyeli ve Damlacık Boyutu Ölçümü	63
3.3.2	UV-VIS Spektroskopisi	64
3.3.3	Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	65
3.4	Hücre Kültürü	65
BÖLÜM 4		
DENEYSEL KISIM		67
4.1	UV-VIS Spektrofotometre ile Analitik Validasyon	67
4.1.1	Doğrusallık	68
4.1.2	Doğruluk	70
4.1.3	Keskinlik	71

4.1.3.1	Gün İçi Kesinlik.....	71
4.1.3.2	Günler Arası Kesinlik	72
4.1.4	Stabilite	72
4.2	Ön Formülasyon Çalışmaları	74
4.2.1	Hazırlanacak Formülasyon İçeriklerinin ve Üretim Prosesinin Optimize Edilmesi.....	74
4.2.2	Hızlandırılmış Stabilite Testleri.....	76
4.2.2.1	Santrifüj Testi.....	76
4.2.2.2	Termal Stres Testi	76
4.2.3	Formülasyonların Fizikokimyasal Stabilite Testleri ve Karakterizasyonu.....	78
4.2.4	Isıtma-Soğutma Testi.....	78
4.2.5	Yaşlandırma Testleri	79
4.2.5.1	Organoleptik Kontroller	80
4.2.5.2	Zeta Potansiyeli ve Boyut Ölçümü	80
4.2.5.3	Viskozite Tayini	83
4.2.5.4	pH ve İletkenlik Ölçümü	94
4.2.5.5	Etkin Madde İçerik Tayini	96
4.3	Piperinin Çözünürlük Tayini	98
4.4	<i>In vitro</i> Salım Çalışması	100
4.5	AFM Analizi	101
4.6	Oluşturulan Nanoemülsiyonların L929 Fibroblast Hücreleri Üzerinde Toksik Etkisinin MTT Yöntemi İle İncelenmesi	103
BÖLÜM 5		
SONUÇ VE ÖNERİLER.....		109
KAYNAKLAR		113
ÖZGEÇMİŞ.....		127

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
>	Büyüktür
R^2	Determinasyon katsayısı
g	Gram
kg	Kilogram
kHz	Kilohertz
kV	Kilovolt
<	Küçüktür
p	Laplace basıncı
L	Litre
MPa	Megapascal
mV	Megavolt
μ g	Mikrogram
μ m	Mikrometre
μ M	Mikromolar
μ s	Mikrosiemens
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
Psi	Pounds per square inch
rpm	Rotations per minute
s	Saniye
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
cm	Santimetre
%	Yüzde
γ	Yüzeyler arası gerilim
t	Zaman
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

APC	Antijen sunan hücreler
C(max)	Maksimum konsantrasyon
DEJ	Dermoepidermal junction
DHI	5,6-dihidroksiindol
DHICA	DHI-2-karboksilik asit
DLS	Dinamik ışık saçılımı
EDN3	Endotelin 3
EIP	Emülsiyon dönüşüm noktası
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör
GOT	Glutamik-oksaloasetik transaminaz
GPT	Glutamik pirüvik transaminaz
GRAS	Generally Recognized as Safe
H	Homojen
HLB	Hidrofilik lipofilik denge
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IgA	İmmünglobulin A
IgG	İmmünglobulin G
K	Koalesans
KFA	Kısmi Faz ayrımı
LDE	Lazer doppler elektroforez
MAO-A	Monoamin oksidaz inhibitörü
mlph	Melanofilin
MSH	Melanosit stimüle edici hormon
NE	Nanoemülsiyon
NMF	Doğal nemlendirici faktör
PBS	Fosfat Tamponu
PCS	Foton korelasyon spektroskopisi
PdI	Polidispersite indeksi
PIC	Faz dönüşüm bileşimi
PIT	Faz dönüşüm sıcaklığı
PKC	Protein kinaz C
POMC	Proopiomelanokortin
R.N.	Relatif nem

ROS	Reaktif oksijen türleri
RSD	Relatif standart sapma
SCF	Kök hücre faktörü
SEDDS	Kendiliğinden emülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SLS	Statik ışık saçılması
SNEDDS	Kendiliğinden nanoemülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler
SS	Standart sapma
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TEWL	Transepidermal su kaybı
TFA	Tam Faz ayrımı
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
TYR	Tirozinaz
TYRP1	Tirozinaz ile ilgili protein-1
TYRP2	Tirozin ilişkili protein 2
TYRP2/DCT	Dopakrom tatomeraz
UV	Ultraviyole
WS	Waardenburg Sendromu

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1	Damlacık boyutları sırasıyla 35 nm ve 1 mm olan bir nanoemülsiyonun (solda) ve makroemülsiyonun (sağda) görüntüsü	5
Şekil 2.2	Ultrasonik homojenizasyon yöntemi ile nanoemülsiyon eldesinin şematik gösterimi	11
Şekil 2.3	Franz difüzyon hücresinin şematik gösterimi	19
Şekil 2.4	Derinin yapısı	29
Şekil 2.5	Epidermisin katmanları	31
Şekil 2.6	Bazal tabakada hücre oluşumunun şematik gösterimi	32
Şekil 2.7	DEJ'nin histopatolojik görünümü	36
Şekil 2.8	Epidermisin yapısı	38
Şekil 2.9	UV radyasyona maruziyetinde melanin pigmentinin rolü	39
Şekil 2.10	Melanogenez sırasında melanositlerdeki melanin sentezinin sadeleştirilmiş şeması	40
Şekil 2.11	Melanin sentezi sırasında melanozomların gelişim aşamalarının özellikleri	42
Şekil 2.12	Yüzdeki vitiligo lezyonları	50
Şekil 2.13	Piperinin moleküler yapısı	53
Şekil 2.14	Vitiligonun neden olduğu düzensiz cilt, saç ve kirpikte görülen depigmente lezyonlar	57
Şekil 3.1	MTT reaktantının mor renkli formazan kristaline indirgenmesi	66
Şekil 4.1	Metanolde çözündürülmüş piperine ait UV spektrumu	67
Şekil 4.2	Analitik yöntemin doğrusalılık ölçümü için hazırlanan çözeltiler	68
Şekil 4.3	Piperinin kalibrasyon doğrusu grafiği	69
Şekil 4.4	Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı	80
Şekil 4.5	Etkin madde tayini için ultrasonik banyoda karıştırılan numuneler	97
Şekil 4.6	Piperin içeren F3P2 kodlu formülasyona ait salım grafiği (n=3)	101
Şekil 4.7	F1P1 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 µm) AFM görüntüsü	102
Şekil 4.8	F1P2 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 µm) AFM görüntüsü	102
Şekil 4.9	F1P3 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 µm) AFM görüntüsü	103
Şekil 4.10	F2P2 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 µm) AFM görüntüsü	103
Şekil 4.11	Kültürde çoğalan L929 hücrelerinin görünümü (x20)	104
Şekil 4.12	F1P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği	105
Şekil 4.13	F1P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği	106

Şekil 4.14	F2P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği	106
Şekil 4.15	F2P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği	107
Şekil 4.16	F3P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği	108
Şekil 4.17	F3P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği	108



ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Hipopigmentasyon ve depigmentasyon ile genodermatozlar	47
Çizelge 4.1 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğrusallığına ait bulgular (n=3)	69
Çizelge 4.2 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğruluğuna ait bulgular (n=3)	70
Çizelge 4.3 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin gün içi kesinliğine ait bulgular (n=3)	71
Çizelge 4.4 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin günler arası kesinliğine ait bulgular (n=3)	72
Çizelge 4.5 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin stabilitesine ait bulgular (n=3)	73
Çizelge 4.6 Belirlenen formülasyon içeriği	74
Çizelge 4.6 Belirlenen formülasyon içeriği (devamı)	75
Çizelge 4.7 Hızlandırılmış stabilite testleri sonucu elde edilen veriler	76
Çizelge 4.7 Hızlandırılmış stabilite testleri sonucu elde edilen veriler (devamı)	77
Çizelge 4.8 Formülasyonların 1. günde ve ısıtma-soğutma testinden sonra ölçülen ortalama damlacık çapı, Pdl ve zeta potansiyeli değerlerine ait bulgular ..	78
Çizelge 4.8 Formülasyonların 1. günde ve ısıtma-soğutma testinden sonra ölçülen ortalama damlacık çapı, Pdl ve zeta potansiyeli değerlerine ait bulgular (devamı)	79
Çizelge 4.9 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen ortalama damlacık çapı değerleri ..	81
Çizelge 4.10 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen zeta potansiyeli değerleri	81
Çizelge 4.10 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen zeta potansiyeli değerleri (devamı)	82
Çizelge 4.11 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen polidispersite indeksleri (Pdl)	82
Çizelge 4.12 F1P1 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	83
Çizelge 4.13 F1P2 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	84
Çizelge 4.14 F2P1 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	85
Çizelge 4.15 F2P2 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	86
Çizelge 4.16 F3P1 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	87
Çizelge 4.17 F3P2 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	88
Çizelge 4.18 F1P3 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	89
Çizelge 4.19 F1P4 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	90
Çizelge 4.20 F2P3 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	91
Çizelge 4.21 F2P4 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	92

Çizelge 4.22	F3P3 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	93
Çizelge 4.23	F3P4 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular	94
Çizelge 4.24	pH-metre cihazı ile elde edilen pH ölçüm sonuçları	95
Çizelge 4.25	Formülasyonların iletkenlik değerleri	96
Çizelge 4.26	Formülasyonların 5°C, 25°C ve 40°C'deki etkin madde stabilitelerine ait bulgular	97
Çizelge 4.26	Formülasyonların 5°C, 25°C ve 40°C'deki etkin madde stabilitelerine ait bulgular (devamı)	98
Çizelge 4.27	Piperinin belirli çözünme ortamlarındaki çözünürlüklerine ait veriler (n=3)	99
Çizelge 4.28	Piperin içeren F3P2 kodlu formülasyona ait salım verileri.....	100
Çizelge 4.28	Piperin içeren F3P2 kodlu formülasyona ait salım verileri (devamı)	101



HİPOPIGMENTASYON PROBLEMİNE YÖNELİK BİTKİSEL İÇERİKLİ TOPİKAL NANOEMÜLSİYONLARIN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Burcu ÖZKAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ

İnsan derisi, beyazdan kahverengiye, kahverengiden siyaha kadar geniş bir aralıkta farklı renk ve tona sahiptir. Bu durumun sebebi, ciltte bulunan melanin ismindeki kimyasal olarak inert ve stabil bir pigmentin varlığı ve miktarıdır. Melanin pigmentinin sentezinden sorumlu biyokimyasal bir yolak olan melanogenez, melanosit hücrelerinde melanozomlar olarak adlandırılan organallerde meydana gelen kompleks bir olaydır. Bu süreç bozulduğunda, ciltte hipopigmentasyon veya hiperpigmentasyon olarak sınıflandırılan farklı pigmentasyon hasarları meydana gelmektedir. Pigment hücreleri olan melanositler, vitiligo gibi cilt rahatsızlıklarında fonksiyonel epidermal melanositlerin kaybı nedeniyle büyük ölçüde yok olmaktadır. Bu nedenle de deride depigmente olmuş lezyonlar meydana gelmektedir.

Günümüzde vitiligo hastalığının tedavisinde; cilde kortikosteroidlerin uygulanması ve cilt pigmentasyonunu yeniden kazandırmak için UV radyasyon kullanılarak uygulanan fototerapi gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu tedavi yöntemlerinin uzun vadede lekeli ve düzensiz bir pigmentasyona neden olduğu, cilt kanserine yol açtığı ve her zaman etkili olmadığı bilinmektedir. Pigmentasyon hasarlarının hastanın yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olması, tedavilerindeki tatmin edici olmayan sonuçlar ve bu tedaviler sonucu sıklıkla ortaya çıkan yan etkiler nedeniyle, ilaç ve kozmetik endüstrileri devamlı olarak yeni çözümler araştırmaktadır.

Piperin, karabiberdeki oleoresinden elde edilen, Piper longum L. ve Piper nigrum L.'nin acı tadını veren bir alkaloiddir. Pek çok biyolojik aktiviteye sahip olan piperinin, son zamanlarda yapılan araştırmalarda cilt pigmentasyonunu stimüle ederek ve pigmentasyonun tekrar meydana gelmesini sağlayarak, bu mekanizma üzerine de etkili olduğu gösterilmiştir. Bu bulguların, daha iyi sonuçlar elde etmenin yanında potansiyel tedavilerin geliştirilmesine yol açabileceği düşünülmektedir. Ayrıca vitiligo tedavisinde UV radyasyona duyulan ihtiyacı azaltarak deri kanseri riskini de düşürme olasılığı yüksektir.

Nanoteknolojinin tıbbi ve farmasötik preparatların üretiminde kullanımı son zamanlarda giderek artmaktadır. Nanoteknoloji alanında inovatif ürün geliştirilmesini sağlayan başlıca teknolojilerden biri de nanoemülsiyonlardır. Nanoemülsiyonlar (NE), doğal ya da sentetik yağların, surfaktan ve kosurfaktanlarla birlikte hazırlandığı ve 500 nm'nin altında damlacık boyuna sahip izotropik karışımlardır. Nanoemülsiyonların klasik emülsiyonlara kıyasla daha yüksek stabilite ve kontrollü salım sağlaması, istenen cilt tabakalarına aktif maddeleri taşıyabilmesi, aktif gıda ve ilaç bileşenlerinin çözünürlüğünü, taşınmasını, dağılılabirliğini, biyoyararlanımını ve biyoerişebilirliğini arttırması sayesinde önemli bir sistem haline gelmiştir.

Bu tez çalışmasında, dünyada ve ülkemizde ilk kez olarak, literatürde farklı çalışmalar ile melanin pigmentinin oluşumunu arttırdığı ispatlanan ancak nanoemülsiyon şeklinde kullanımı bulunmayan piperinin, melanogenezi stimüle ederek vitiligo gibi bazı hipopigmentasyon hastalıklarını gidermeye yönelik topikal nanoemülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir. Bu kapsamda, öncelikle piperinin formülasyonlardaki miktarının tayini için UV spektrofotometrede yöntem belirlenmiş ve bu yöntemin analitik validasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra, formülasyon bileşiminde yer alan maddeler ve bu maddelerin konsantrasyonları belirlenmiş ve üretim yöntemi olan ultrasonikasyon prosesinin parametreleri optimize edilmiştir.

Piperin NE'leri, 15 mg, 30 mg, 150 mg, 300 mg ve 600 mg içerecek şekilde hazırlanmıştır. Sonrasında, formülasyonlara hızlandırılmış stabilite testleri olan santrifüj ve termal testler uygulanarak, kinetik ve termodinamik stabilite açısından ön bir değerlendirme yapılmıştır. Bu testler sonucunda stabil kalan formülasyonlar seçilmiştir ve fizikokimyasal stabilite testlerine tabi tutulmuştur. 3 ay boyunca, 3 farklı koşulda (oda sıcaklığında, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %65 relatif nem, buzdolabında, $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve iklimlendirme kabininde, $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %75 relatif nem) bekletilen formülasyonlarda belirlenen zaman aralıklarında (1. gün, 1. ay, 2. ay, 3. ay) pH, iletkenlik, viskozite, ortalama damlacık boyutu, Pdl değerleri, zeta potansiyeli ve etkin madde içerik analizleri yapılmıştır.

Bu tez çalışmasının sonucunda geliştirilen piperin NE'leri kullanılarak, konvansiyonel tedavi yöntemlerine kıyasla daha iyi tedavi sonuçları elde etmenin yanında potansiyel tedavilerin de geliştirilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, hazırlanan nanoteknolojik ürünün vitiligo tedavisinde UV radyasyona duyulan ihtiyacı azaltarak, deri kanseri riskini de düşürebileceği beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Piperin, vitiligo, topikal, nanoemülsiyon, melanogenezi, pigmentasyon

PREPERATION, CHARACTERIZATION AND IN VITRO EVALUATION OF TOPICAL NANOEMULSIONS FOR HYPOPIGMENTATION DISORDERS

Burcu ÖZKAN

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assist.Prof. Rabia ÇAKIR KOÇ

Human skin has a wide range of different color from white to brown and brown to black. This situation is based on the presence of a chemically inert and stable pigment named melanin in the skin.

Melanogenesis is a biochemical and complex pathway that is which occurs in melanocyte cells that is found in organelles called melanosomes and responsible for the synthesis of melanin pigment. Different skin pigmentation defects classified as hypo or hyperpigmentation occur when this process is disrupted.

The pigment cells, melanocytes, are destroyed due to the loss of functional epidermal melanocytes in the skin condition vitiligo. Therefore, depigmented skin lesions occur on the skin. However, these treatments lead to irregular pigmentation and skin cancer in the long term and they are not always effective. Pharmaceutical and cosmetic industries are constantly researching new solutions because of a significant impact of pigmentation diseases on a patient's life quality, unsatisfactory results of treatment and side effects of conventional treatments.

Piperine is an alkaloid obtained from oleoresin pepper and it gives bitter taste to Piper longum L. ve Piper nigrum L. Piperine with many biological activities stimulates the skin pigmentation and provides the re-occurrence of pigmentation. These findings may lead to better results in the development of potential treatments. The risk of skin cancer may decrease by reducing the need for UV irradiation treatment of vitiligo.

The use of nanotechnology in medical and pharmaceutical preparates has been increasing recently. Nanoemulsion is one of the technique that provides the development of innovative products in the field of nanotechnology. Nanoemulsions are isotropic mixture with droplets sizes below 500 nm and they are prepared by combining natural or synthetic oils, and the surfactant and cosurfactants. Nanoemulsions have become important system due to their greater stability and controlled release compared to conventional emulsions, they are able to carry active ingredients to the desired skin layer and they increase bioavailability, dispersibility of the food and pharmaceutical active ingredients.

In this thesis, topical nanoemulsions that is intended to treat some of hypopigmentation disorders such as vitiligo by stimulating melanogenesis of piperine which is proven to increase the formation of melanin pigment by different studies in the literature were developed.

In this context, first UV spectrophotometry method selected for the determination of the amount of piperine in the formulation and analytical validation studies of this method have been made.

Then, substances in the formulations and their concentrations were determined and manufacturing method the ultrasonication process parameters were optimized. Nanoemulsions were prepared that contain 15 mg, 30 mg, 150 mg, 300 mg ve 600 mg of piperine.

Pre-evaluation of stability was made in terms of kinetic and thermodynamic by applying centrifuge and accelerated thermal tests.

Stable formulations were selected according to test results and subjected to physico-chemical stability tests and physicochemical stability tests were carried out with selected formulations.

pH, conductivity, viscosity, average droplet size, Pdl values, zeta potential and active ingredient content analyzes were conducted with the formulations at 3 different conditions (room temperature, $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 65% relative humidity, in the refrigerator at $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ and in air conditioning cabin to $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ and 75% relative humidity) at the specified time for 3 months.

As a result of this study, it is aimed to develop potential therapies and as well as obtain better therapeutic outcomes than conventional treatments by using piperine nanoemulsions. Further, it is expected to the prepared nanotechnological product reduce the risk of skin cancer by reducing the need for UV irradiation in treatment of vitiligo.

Keywords: Piperine, vitiligo, topical, nanoemulsion, melanogenesis, pigmentation

1.1 Literatür Özeti

Melanogenez farklı evrelere sahip kompleks bir süreçtir. Bu süreç bozulduğunda, hipo veya hiperpigmentasyon olarak sınıflandırılan farklı pigmentasyon hasarları meydana gelmektedir [1-3].

Pigment hücreleri olan melanositler, vitiligo gibi cilt rahatsızlıklarında fonksiyonel epidermal melanositlerin kaybı nedeniyle büyük ölçüde yok olmaktadır. Bu nedenle de deride depigmente olmuş lezyonlar meydana gelmektedir [4]. Günümüzde vitiligo hastalığının tedavisinde kullanılan yöntemler; cilde kortikosteroidlerin uygulanmasını ve cilt pigmentasyonunu yeniden kazandırmak için UV radyasyon kullanılarak uygulanan fototerapiyi içermektedir [5]. Ancak bu tedavi yöntemlerinin uzun vadede birçok yan etkisinin olduğu ve her zaman etkili olmadığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda, özellikle kortikosteroid tedavisinin uygulandığı hastaların %25'inden daha azında başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. UV radyasyon ile tedavide ise; lekeli ve düzensiz bir pigmentasyon elde edilirken, uzun vadede cilt kanserine yol açma riski söz konusudur [6, 7].

Pigmentasyon hasarlarının hastanın yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olması ve tedavilerindeki tatmin edici olmayan sonuçlar nedeniyle, ilaç ve kozmetik endüstrileri devamlı olarak yeni çözümler araştırmaktadır [8, 9]. *Piper longum* L. (uzun biber) ve *Piper nigrum* L. (karabiber) (Piperaceae), geleneksel olarak Hint tıbbında ve genel olarak bir baharat olarak kullanılmaktadır. Piperin, karabiberdeki oleoresinden elde edilen, *Piper longum* L. ve *Piper nigrum* L.'nin acı tadını veren bir alkaloiddir [10].

Literatürde bu bileşenin, antidepresan, biyolojik aktiviteyi arttırıcı, antioksidan, anti-platelet antiinflamatuvar, antihipertansif, hepatoprotektif, antitiroid, antitümoral ve antiastmatik gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [11].

Son zamanlarda, piperinin bu biyolojik aktivitelerinin yanı sıra pigmentasyon mekanizması üzerine de etkili olduğu saptanmıştır. King's College London'dan bir grup bilim adamı, karabibere onun baharatlı, keskin tadını veren temel alkaloid piperini keşfetmişlerdir. Piperin ve sentetik türevlerinin cilt pigmentasyonunu stimüle ettiğini ve ciltte pigmentasyonun tekrar sağlanmasında etkili olduğunu göstermişlerdir [7]. Soumyanath ve ark.ları tarafından yürütülen çalışmada, piperin *in vitro* ortamda melanosit proliferasyonunu arttırmıştır. Piperinin, protein kinaz C stimülasyonu yoluyla etki ettiği gösterilmiştir [12]. Yapılan diğer bir çalışmada, piperinin sulu ekstresi (0,1 mg/ml) ile 8 gün içinde fare melanosit hattı kültürünün büyümesinin yaklaşık %300 oranında uyarılmasının sağlandığı gözlenmiştir [13].

Bu tez çalışmasında, literatürde pigmentasyon üzerine etkinliği ispatlanmış piperin içeren hipopigmentasyon rahatsızlıklarında kullanılması amaçlanan topikal nanoemülsiyon formülasyonları hazırlandı. Bu kapsamda, öncelikle piperinin formülasyonlardaki miktarının tayini için UV spektrofotometrede yöntem belirlendi ve bu yöntemin analitik validasyon çalışmaları yapıldı. Daha sonra, formülasyon bileşiminde yer alan maddeler ve bu maddelerin konsantrasyonları belirlendi ve üretim yöntemi olan ultrasonikasyon prosesinin parametreleri optimize edildi. Piperin NE'leri, 15 mg, 30 mg, 150 mg, 300 mg ve 600 mg içerecek şekilde hazırlandı. Sonrasında, formülasyonlara hızlandırılmış stabilite testleri olan santrifüj ve termal testler uygulanarak, kinetik ve termodinamik stabilite açısından ön bir değerlendirme yapıldı. Bu testler sonucunda stabil kalan formülasyonlar seçildi ve fizikokimyasal stabilite testlerine tabi tutuldu. 3 ay boyunca, 3 farklı koşulda (oda sıcaklığında, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %65 relatif nem, buzdolabında, $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve iklimlendirme kabininde, $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %75 relatif nem) bekletilen formülasyonlarda belirlenen zaman aralıklarında (1. gün, 1. ay, 2. ay, 3. ay) pH, iletkenlik, viskozite, ortalama damlacık boyutu, Pdl değerleri, zeta potansiyeli ve etkin madde içerik analizleri yapıldı.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında, literatürde farklı çalışmalar ile melanin pigmentinin oluşumunu arttırdığı ispatlanan ancak nanoemülsiyon şeklinde kullanılmamış piperinin, melanogenezi stimüle ederek vitiligo gibi bazı hipopigmentasyon hastalıklarını gidermeye yönelik topikal nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, formülasyon ve karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra seçilen nanoemülsiyonlar üzerinde hızlandırılmış stabilite ve fizikokimyasal stabilite testleri yürütülerek en uygun formülasyon tespit edilmiştir.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında, literatürde pigmentasyon üzerine etkinliği ispatlanmış piperin içeren hipopigmentasyon rahatsızlıklarında kullanılması amaçlanan topikal nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Elde edilen formülasyon, karakterizasyon ve stabilite çalışmalarının ardından piperinin biyolojik aktivitesinden en yüksek oranda yararlanılabilecek, nano skalada damlacık boyutuna sahip, fizikokimyasal olarak stabil olan topikal bir ürün olarak geliştirilmesi hedeflenmektedir. Böylece elde edilen formülasyon ile, konvansiyonel tedavi yöntemlerine kıyasla daha iyi tedavi sonuçları elde etmenin yanında potansiyel tedavilerin de geliştirilmesi beklenmektedir. Ayrıca, hazırlanan nanoteknolojik ürünün vitiligo tedavisinde UV radyasyona duyulan ihtiyacı azaltarak, deri kanseri riskini de düşürebileceği düşünülmektedir.

GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoemülsiyonlar

Nanoteknoloji, şekil ve boyut kontrol edilerek nanometre skalasında (genellikle 0,1-100 µm) sistemlerin tasarım, karakterizasyon, üretim ve uygulamasını içeren inovatif bir bilimdir. Nanoteknolojinin tıbbi ve farmasötik ürünlerde kullanımı son zamanlarda giderek artmaktadır. Nanoteknolojiye dayalı geliştirilen farmasötikler “nanofarmasötikler” olarak adlandırılmaktadır [14].

Nanoteknoloji alanında inovatif ürün geliştirilmesini sağlayan başlıca teknolojilerden biri de nanoemülsiyonlardır (NE). Miniemülsiyonlar, ultra ince emülsiyonlar veya submikron emülsiyonlar olarak da bilinen NE’ler, doğal ya da sentetik yağların, surfaktan ve kosurfaktanlarla birlikte hazırlandığı metastabil (kinetik olarak stabil), izotropik karışımlardır [15, 16].

NE’lerin karaktersitik boyutları nedeniyle çıplak gözle bakıldığında şeffaf veya yarı şeffaf şekilde görülürler (Şekil 2. 1) ve sedimentasyon ve kremalaşmaya karşı dayanıklıdır [17].



Şekil 2. 1 Damlacık boyutları sırasıyla 35 nm ve 1 mm olan bir nanoemülsiyonun (solda) ve makroemülsiyonun (sağda) görüntüsü [17]

Literatürde NE'lerin ortalama damlacık boyutlarının 50-1000 nm, 20-500 nm ve 100-200 nm arasında olduğu bahsedilmekle birlikte genellikle 50-500 nm aralığında damlacık boyuna sahip oldukları bildirilmektedir [18]. NE'ler, aktif gıda ve ilaç bileşenlerinin (ör; karotenoidler, α -tokoferol, antioksidanlar, çoklu doymamış yağ asitleri, hidrofobik vitaminler, tat ve aroma maddeleri) çözünürlüğünü, taşınmasını, dağılılabilirliğini, biyoyararlanımını ve biyoerişebilirliğini artırır.

Ayrıca konvansiyonel emülsiyonlara kıyasla mükemmel enkapsülasyon sistemleri olarak hareket edebilirler [19-21].

2.1.1 Nanoemülsiyonların Avantajları

1. NE'lerin çok küçük damlacık boyutuna sahip olması, yer çekimi ve Brownian hareketinde önemli ölçüde bir azalma meydana getirir. Böylelikle, kremalaşma, sedimentasyon, faz ayrımı, koalesans gibi klasik emülsiyonların stabilite problemleri engellenerek raf ömrünü uzatılır.
2. NE'lerin geniş yüzey alanına sahip olmasıyla aktiflerin cilde hızlı ve etkili penetrasyonu sağlanabilir. Bu sayede, geçimsizliğe neden olabilen kimyasal penetrasyon arttırıcılardan kaçınılabilir.
3. NE'ler toksik ya da iritan olmadıklarından cilde ve mukoz membranlara kolaylıkla uygulanabilirler.
4. Kıvam arttırıcı kullanmadan ciltte hoş ve estetik bir his meydana getirirler.

5. Yüksek oranda surfaktan ile hazırlanan mikroemülsiyonların aksine (genellikle % 20 civarında veya daha fazla), NE'ler makul miktarda surfaktan ile hazırlanabilirler.
6. NE'lerin hazırlanmasında kullanılan surfaktanların insan tüketimi için güvenli olduğu onaylanmıştır (GRAS).
7. NE'ler lipofilik bileşenlerin taşınmasında, stabilite problemi olan lipozomlardan daha uygun bir ortam oluştururlar.
8. Biyoaktif etkilere sahip olduklarından ciltteki su kaybını azaltarak, cildin bariyer fonksiyonunu desteklerler.
9. İç fazdaki damlacıkları hidroliz ve oksidasyon gibi çevresel zararlardan korurlar [22, 23].

2.1.2 Nanoemülsiyonların Dezavantajları

1. NE'lerin hazırlanmasında yüksek basınçlı homojenizatörler ve ultrasonikatörler gibi pek çok özel uygulama tekniklerinin gerekli olması (örneğin, mikroakışkanlaştırıcı gibi ekipmanlar, sadece son yıllarda kullanılabilir hale gelmiştir),
2. Kişisel bakım ve kozmetik endüstrisinde NE'lerin üretiminin pahalı olduğu algısı,
3. Submikron damlacıkların üretim mekanizmalarını ve surfaktan ve kosurfaktanların formülasyondaki rolünü anlamada bilgi eksikliği,
4. Klasik makroemülsiyon sistemlerine kıyasla NE'lerin kullanımıyla elde edilebilecek faydaların tam olarak bilinmemesi,
5. NE'lerin üretiminde yer alan arayüzey kimyası ve NE'lerde görülen en ciddi stabilite problemi olan Ostwald olgunlaşmasının mekanizması hakkında yetersiz bilgiye sahip olunması,
6. Ostwald olgunlaşmasının meydana gelmesini önlemek amacıyla kullanılabilecek bileşenler hakkında bilgi yetersizliği (örneğin, çok düşük çözünürlükteki ikinci bir yağ fazının veya yağ-su arayüzeyine güçlü şekilde adsorbe olabilen polimerik bir surfaktanın ilave edilmesi),
7. Maliyet ve faydaların tam değerlendirmesi yapılmadan yeni sistemlerin tanıtılmasında yaşanan korku [23].

2.1.3 Nanoemülsiyonların Oluşum Mekanizması

Yağ ve su fazlarının serbest enerjisi, oluşan emülsiyondan her zaman daha düşük olduğundan NE damlacıkları yalnızca kinetik olarak stabildir. Bu nedenle NE'ler kendiliğinden meydana gelemez [24].

Büyük emülsiyon damlacıklarını nanodamlacıklara dönüştürmek için homojenizasyon sırasında Laplace basıncını, p (Pa; kavisli arayüzeyin konveks ve konkav tarafları arasındaki basınç farklılığı) yenmek ve yağ ve su fazları arayüzeyini parçalamak amacıyla büyük bir eksternal kuvvetin (homojenizasyon basıncı, P_a ; her bir hacim sıvıya uygulanan enerji) uygulanması gerekir [25, 26] (Denklemler 2.1).

Laplace basıncı, damlacıkları bozulmadan korumada rol oynayan yüzeyler arası kuvveti karakterize eder [27].

$$P = \frac{2\gamma}{r} \quad (2.1)$$

$r(m)$: Damlacıkların eğrilik yarıçapları (damlacıkların küresel olduğu varsayılmaktadır).

$\gamma (N m^{-1})$: İki faz arasındaki yüzeyler arası gerilim.

NE'lerin oluşumunda, surfaktanlar yüzeyler arası gerilimi düşürerek başlıca rol oynar. Laplace basıncı ve bir damlacığı parçalamak için gerekli olan stres azaltılır. Böylelikle surfaktanlar, oluşan yeni damlacıkları koalesanstan korur [23].

2.1.4 Nanoemülsiyon Hazırlama Metodları

Nanoemülsiyonlar temel olarak 2 kategori altında hazırlanırlar.

1) Yüksek enerjili metodlar

2) Düşük enerjili metodlar

Yüksek enerji kullanılan metodlar su ve yağ fazlarının parçalanmasını ve küçük damlacıklar oluşmasını sağlayan ultrasonikatörler, yüksek kaymalı karıştırıcılar, mikroakışkanlaştırıcılar ve yüksek basınçlı homojenizatörler gibi mekanik ekipmanları içerirken, faz dönüşüm sıcaklığı (PIT), emülsiyon dönüşüm noktası (EIP) ve kendiliğinden emülsifikasyon gibi düşük enerjili metodlar ortam şartlarına bağlı olarak emülgatörlerin kullanımı ile kendiliğinden nano boyuttaki damlacıkların oluşması esasına dayanır [15].

Yüksek enerjili metodlarda partikül boyutu, formülasyon bileşimi ve özellikleri ile birlikte ekipman tipine ve üretim şartlarına (zaman, sıcaklık vb.) bağlıdır [28]. Yüksek enerjili metodlar, partikül boyutunun daha fazla kontrol edilebilmesini ve bileşimde kullanılan maddelerde geniş bir seçim şansı elde etmeyi sağlarlar. Böylelikle, stabilite, reoloji ve emülsiyon renginin kontrol edilebilmesi mümkün olmaktadır. Bu metodlar, endüstriyel ölçek büyötmeyi ve istenen özelliklerde NE'lerin üretimini sağlarken, ısıya hassas retinoidler ve proteinler, enzimler ve nükleik asitler gibi makromoleküller için uygun olmayabilir [16].

NE'ler, faz davranışı ve bileşenlerin özelliklerine bağlı olarak son zamanlarda geliştirilen ve ultra küçük damlacıkların oluşumunu destekleyen düşük enerjili metodlar ile de hazırlanabilir [17, 22]. Düşük enerjili metodlar, küçük damlacıkların oluşumu için sistemde depolanmış enerjiyi kullandıklarından ilgi çekmektedir. Bu emülsifikasyon, sıcaklık ve formülasyon bileşimi gibi hidrofilik lipofilik dengeyi (HLB) etkileyen parametreler değiştirilerek gerçekleştirilebilir [29, 30].

2.1.4.1 Yüksek Enerjili Metodlar

Mekanik ekipmanlarla, nano boyuttaki damlacıkların oluşması için gerekli yüksek parçalama gücü sağlanabilir. Damlacıkların küçük ve küre halinde tutulabilmesi için yoğun enerji gerekmektedir. NE oluşturmak için gerekli olan bu enerji Laplace basıncı tarafından belirlenir. Bu basınç damlacık yarıçapı azaldıkça ve yüzeyler arası gerilim arttıkça artar.

İstenen boyutta damlacığın oluşturulabilmesi için üretim metodu, uygulanan enerjinin büyüklüğü, proses koşulları, formülasyonun bileşimi, fazların fizikokimyasal özellikleri kritik önem taşır. Kullanılan yöntemler arasında; yüksek basınçlı homojenizasyon, mikroakışkanlaştırma, yüksek kaymalı karıştırma ve ultrasonik homojenizasyon bulunmaktadır [15, 31].

Bu yöntemlerle hazırlanan NE'lerde, yeterli miktarda surfaktan kullanılmadığında, zaman içerisinde koalesans görülebilir. Bir diğer önemli faktör ise surfaktanın velositesidir. Eğer surfaktan velositesi koalesans velositesinden düşükse, sistem stabil olmayacaktır [32]. Bu faktör özellikle yağda çözünür surfaktanların kullanıldığı ters emülsiyonlar için önemlidir. Bunun nedeni, organik fazdaki arayüzeye difüze olan surfaktan velositesinin su fazına difüze olandan daha düşük olmasıdır [33].

Yüksek enerjili nanoemülsifikasyon metodları genel olarak hem su içinde yağ hem de yağ içinde su tipi NE üretiminde kullanılırken, formülasyonun bütün parametreleri kontrol edilebildiğinden polimerik nanopartikül oluşturulması adına da oldukça önemli potansiyel taşımaktadır. Ayrıca, monomerler, enkapsüle edici moleküller ve diğer yardımcı maddeler emülsifikasyon prosesini etkilemez. Ancak, ek moleküllerin enkapsüle edilmesi durumunda bu yardımcı maddeler emülsifikasyonda önemli hale gelebilir. Fakat, düşük enerjili metodlardaki gibi, emülsifikasyon tamamen surfaktanların fizikokimyasal özelliklerine bağlı değildir. Peptid, protein, nükleik asit gibi hassas moleküllerin enkapsülasyonu söz konusu olduğunda, yüksek enerjili metodlar ilaç degradasyonunun ve denaturasyonun artmasına, böylelikle ilacın etkisini kaybetmesine sebebiyet verebilir [31, 32].

a) Yüksek Basınçlı Homojenizasyon

Bu teknikte yüksek basınçlı piston kullanılarak 1 nm ye kadar küçültülebilen damlacık boyutlu NE'ler elde edilebilir. Su fazı ve yağ fazının dispersiyonu, sıvıların dar bir ağızdan 500'den 5000 psi'a kadar değişen yüksek basınçlarda geçirilmesi ile elde edilir. Bu metod, yağ ve su fazlarının birleştirilmesiyle NE oluşturmaktansa, kaba emülsiyonların damlacık boyutunu küçülterek NE hazırlanmasında daha etkilidir. Genel olarak karıştırıcıda hazırlanan kaba emülsiyon ekipmanın içine tatbik edilir.

Basınçla valften geçen formülasyon, çok yüksek türbülansa ve hidrolik parçalanmaya uğrayarak çok küçük damlacıklar oluşturur. Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği NE yapımında oldukça etkilidir. Büyük ölçekli üretim için uygun olması ve üretim serileri arasında varyasyonun düşük olması gibi avantajlara sahiptir.

Dezavantajları ise metodun yüksek enerji tüketimi ve proses esnasında sıcaklığın artmasıdır. Bu nedenle sıcaklıkla bozulmayan maddelerin formüle edilmesi için uygundur. Bu teknikle optimize bir formülasyon oluşturmak için su parametrelere dikkat edilmelidir;

- Homojenizasyon basıncı: Bu parametre 100'den 150 bara kadar çıkabilir. Basınç arttıkça partikül boyutu küçülür.
- Homojenizasyon siklusunun sayısı: Formülasyon sistemden ne kadar fazla geçirilirse o kadar küçük damlacık boyutu elde edilir [34].

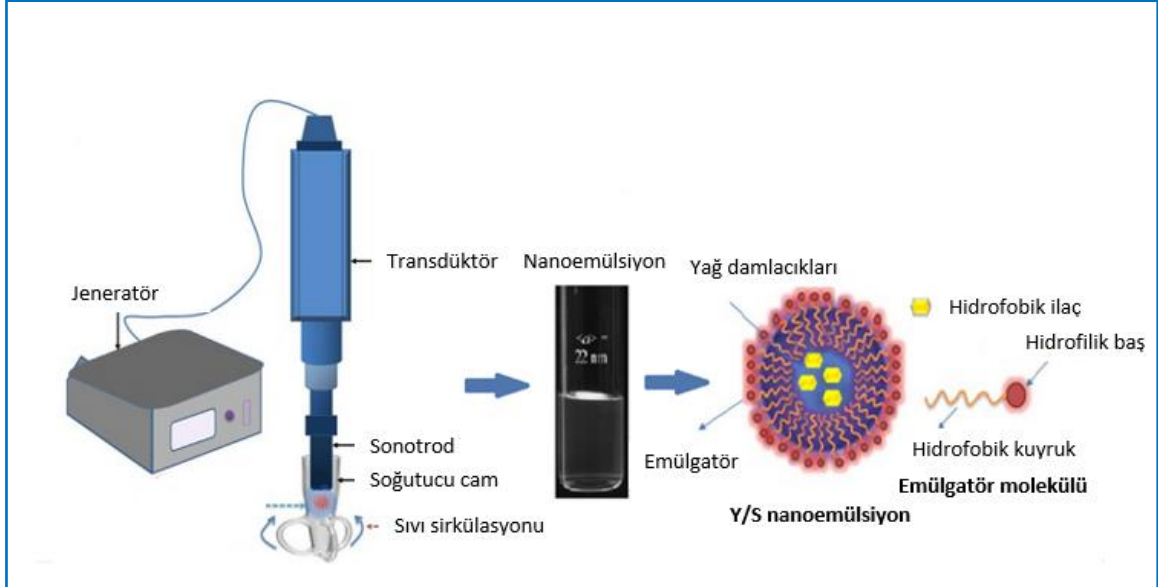
Yüksek basınçlı homojenizasyon, emülsifikasyon işlemi için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Yakın zamanlarda basıncı 350 MPa'ya kadar çıkabilen yüksek basınçlı homojenizatörler geliştirilmiştir. Ancak, bu metod ile formüle edilen su içinde yağ emülsiyonlarında metil selüloz gibi emülgatörlerin kullanılması durumunda çok yüksek basınç nedeniyle uzun zincirli moleküllerin geri dönüşümsüz degradasyonu meydana gelebileceğinden, basınç 150 MPa'dan düşük tutulmalıdır [17].

Yüksek basınçlı homojenizasyon ile elde edilen NE'lerde farklı prosedürler uygulanarak emülsifikasyonun etkinliği artırılabilir. Genellikle disperse fazın yüksek hacimli fraksiyonu NE olarak hazırlanıp, sonradan sistem dilue edilebilir. Ancak çok yüksek oranda dispers fazla çalışmak, emülsifikasyon sırasında koalesans oluşmasına neden olabilir. Bu durumu engellemek amacıyla surfaktan miktarı artırılabilir ya da farklı surfaktan karışımları kullanılabilir. Mümkünse, ilk aşamada surfaktan dispersiyon ortamı yerine dispers faz içinde çözündürülmelidir. Bu teknik daha küçük damlacık boyutuna ulaşılmasını sağlar. Eğer dispers fazın vizkozitesi yüksekse, formülasyonu yükselen yoğunluklarla emülsifiye etmek faydalı olacaktır [17].

Farklı tipte başlıklar kullanılarak homojenizasyonun etkinliği artırılabilir. Bu şekilde, basınçtaki artış ile damlacık boyutu küçülürken, yüzeylerarası gerilim azalır. Ayrıca emülgatörün adsorbsiyon oranı artar ve sistemin vizkozitesi düşer [15, 17].

b) Ultrasonik Homojenizasyon

NE oluşturmak için yüksek enerji kullanılan bir diğer yaklaşım, ultrasonik ses dalgaları kullanılarak damlacık boyutlarının küçültülmesidir (Şekil 2. 2).



Şekil 2. 2 Ultrasonik homojenizasyon yöntemi ile nanoemülsiyon eldesinin şematik gösterimi [35]

Sistemin temel prensibi ultrasonik dalgaların neden olduğu kavitasyondur. Ultrasonik dalgaların sıklığı 20 kHz'den büyüktür. Bu metodla hem kaba emülsiyonların damlacık boyutları nano hale getirilebilir, hem de su ve yağ fazları birbirinden ayrı şekilde tatbik edilerek formülasyon oluşturulabilir [36]. Sisteme enerji girişi, piezoelektrik kristal taşıyan bir sonotrot aracılığıyla verilir. Bu kristal elektrik dalgalarını yoğun basınç dalgalarına çevirir. Böylelikle, damlacık çapını küçültmek için yoğun parçalayıcı kuvvetler meydana gelir [37].

Damlacıklar parçalanırken ortama yüksek miktarda enerji verirler. Çok yüksek enerjide ultrasonikasyon kullanımı, ortamda bulunan su moleküllerinin termal dekompozisyonuna yol açarak, ortama proton ve hidroksil iyon radikallerinin verilmesine neden olur. Bu durum formülasyonda kullanılan surfaktan moleküllerinin de dekompozisyonuna neden olabilir [32, 38].

Damlacık boyutu, yağ ve emülsifiyan konsantrasyonu, yağ fazının surfaktan fazına oranı, devamlı fazın viskozitesi, emülsifikasyon süresi ve enerji girişi gibi proses parametreleri optimize edilerek kontrol edilebilir [39].

Ultrasonik homojenizasyon yönteminin avantajları şunlardır; [40, 41]

1. Ultrasonik homojenizasyon yöntemiyle, diğer tipik rotasyonel karıştırıcılara kıyasla daha ufak partikül boyutu ve yüksek enerji verimliliği sağlanabilmektedir.
2. Ayrıca, bu yöntemle istenen boyutta emülsiyon sağlamak için gerekli surfaktan miktarı, PIT ve EIP gibi düşük enerjili hazırlama yöntemlerine kıyasla önemli ölçüde azaltılabilir.
3. Enerji tüketimi çok daha az olan bu yöntemle, damlacıklar akustik yolla meydana gelir. Bu şekilde oluşan NE sistemlerin, mekanik metodlara kıyasla çok daha stabil ve daha homojen olduğu ortaya konmuştur.
4. Ultrasonik homojenizasyon yöntemi, mikrofluidizasyon yöntemine kıyasla daha ekonomik ve ölçek büyütme üretim masrafları, bakım kolaylığı ve aseptik proses bakımından daha elverişlidir.
5. Ultrasonik homojenizasyon yöntemiyle üretimde, yüksek sıcaklıklar kullanılmadığından, doymamış yağ asitleri içeren bitkisel yağlar ve vitaminler gibi sıcaklığa hassas aktif bileşenler bozulma riski olmadan üretilebilmektedir.

c) Mikroakışkanlaştırıcılar

Mikroakışkanlaştırma, mikrofluidizer olarak adlandırılan bir cihazın kullanıldığı patentli bir karıştırma teknolojisidir. Bu cihaz, formülasyonun etkileşim haznesinden geçmesi için yüksek basınç kullanır. Alette kullanılan yüksek basınç pompası 500'den 20000 psi'a kadar çıkartılabilir. Kaba emülsiyonun, mikroakışkanlaştırıcının mikrokanallarından geçirilmesi sayesinde oldukça stabil NE elde edilebilir. Bu proses istenen damlacık boyutuna sahip homojen bir NE elde etmek için birçok defa tekrarlanır. Daha sonra nitrojen gazı altında filtreleme işlemi ile uniform sistem elde edilebilir [41, 42]. Mikroakışkanlaştırma yöntemi laboratuvar ortamında olduğu kadar endüstriyel ortamda da NE elde edilebilmesini sağlar [16].

d) Yüksek Kaymalı Karıştırma

NE'lerin hazırlanmasında daha önceleri yüksek enerjili karıştırıcılar ve rotor-stator sistemler kullanılmıştır. Bu cihazların karıştırma şiddeti artırılarak iç fazın damlacık boyutu önemli ölçüde azaltılabilir. Ancak, ortalama damlacık boyutu 200-300 nm'den küçük emülsiyonların hazırlanması daha zordur. Konvansiyonel karıştırıcılarda proses parti üretimi şeklinde yürütülebilir. Kesintisiz bir üretim gerçekleştirmek ve dispersiyon üzerindeki kayma gerilimini arttırmak amacıyla, kolloid değirmenleri kullanılmaktadır. Bunların içinde en popüler olanları, daha etkili bir emülsifikasyon gerçekleştirmek için farklı konfigürasyonlara sahip rotor-statorlar olan Silverson akış mikserleridir [43].

Yüksek rotor hızında, dağıtıcı kafa içerisinde yüksek bir seyrelme meydana gelir ve emülsiyon bileşenleri rotor-stator ünitesinde emilir. Merkezkaç kuvvetinin etkisi altında, emülsiyon periferel bölgelere atılır. Statorun iç duvarları ve rotor arasındaki boşlukta yoğun dispersiyon oluşur. Daha sonra emülsiyon yüksek hızda statorun deliğinden geçer ve cihazdan çıkar. Modern cihazlar, emülsifikasyon sırasında havalandırma derecesi çok düşük olacak şekilde tasarlanmıştır. Sistem için mümkün olan maksimum dispersiyon derecesi, tek geçişli sistemle elde edilmez. Bu nedenle konvansiyonel olarak çoklu geçiş kullanılır [32]. Viskoz bir ortam kullanıldığında, yüksek kayma hızının etkinliği önemli ölçüde azalır ve yüksek fraksiyonlu iç faza ve 1 mm'yi geçen damlacık boyutuna sahip emülsiyonlar meydana gelir [44, 45]

2.1.4.2 Düşük Enerjili Metodlar

Çevresel koşulların veya formülasyon bileşenlerinin değiştirilmesi ile spontan şekilde nano damlacık oluşumu esasına dayanır. Bu prensibi kullanan metodlar; PIT, EIP ve kendiliğinden emülsifikasyon yöntemleridir [15]. Bu metodlarda surfaktanların, kosurfaktanların ve ekşiyanların fizikokimyasal özelliklerini değiştirerek düşük enerji ile nano damlacıklar elde edilebilmektedir [31]. Düşük enerjili yöntemler, yüksek enerjililerin aksine, sistemde depolanan enerjinin kullanılmasıyla küçük damlacıkların elde edilmesini sağlar. Bu tip metodların dezavantajları, kompleks prosesler içerebilmeleri, kesin protokollerin uygulanması ve geliştirilmesi gerekliliği ve yüksek miktarda sentetik surfaktanların kullanımıdır [46, 47].

a) Faz Dönüşüm Sıcaklığı

Emülsiyonlarda faz dönüşümü 2 prensiple gerçekleşir. Bunlardan birincisi sistemin HLB değerini etkileyecek faktörlerin değiştirilmesi (örneğin; sıcaklık veya elektrolit konsantrasyonu) ile geçici bir faz dönüşümü elde edilmesidir. Diğer ise dispers fazın hacim fraksiyonunu arttırarak katastrofik bir dönüşüm yapılmasıdır. Katastrofik dönüşüm aynı zamanda sabit sıcaklıkta, surfaktan karışımları kullanarak, surfaktanların HLB değerlerinin değiştirilmesiyle de elde edilebilir [23]. PIT metodu, polietoksillenmiş surfaktanlar gibi noniyonik surfaktanların sıcaklığa bağlı çözünürlüğü için kullanılır.

Böylelikle sıcaklığın bir fonksiyonu olarak surfaktanların yağ ve su fazlarına afiniteleri düzenlenebilir. PIT metodu ile NE hazırlayan Shinoda ve arkadaşları, surfaktan olarak sıcaklık değişimlerinden etkilenen etoksillenmiş noniyonik surfaktan kullanmışlardır. Bu surfaktan tipi, sıcaklık arttırıldığında polietilenoksit zincirinin dehidrasyonu sonucu lipofilik hale gelir. Bu olay PIT metodu ile NE hazırlamanın temelini oluşturur. PIT metodunda yağ, su ve noniyonik surfaktanlar oda sıcaklığında karıştırılır. Bu karışım başlıca yüksek miktarda yağ ve pozitif eğrilik gösteren tek tabakalı surfaktanın birlikte bulunduğu su içinde yağ mikroemülsiyonlarını oluşturur. Bu emülsiyon yavaş yavaş ısıtıldığında, polietoksillenmiş surfaktan lipofilik hale gelir ve daha yüksek sıcaklıklarda, surfaktan yağ fazında tamamen çözünmüş hale gelir. Böylelikle, su içinde yağ tipi emülsiyon faz dönüşümüne uğrayarak, yağ içinde su tipi olur. Bu aşamada tek tabakalı surfaktan negatif eğriliğe sahiptir. Bu metod bileşenlerin ısıtılmasını gerektirdiğinden tretinoin ve peptidler gibi ısıya dayanıksız ilaçların stabilitesini etkilemeden kullanılması zordur. Ancak, ısıya dayanıksız ilaçlarda degradasyonu en aza indirmek için uygun özelliklere sahip bileşenlerin (surfaktanlar) karışımı kullanılarak, dispersiyonun PIT değerini düşürmek mümkün olabilir [16, 23].

b) Emülsiyon Dönüşüm Noktası

NE hazırlamada kullanılan diğer bir yöntem de emülsiyon sisteminin bileşimindeki bir değişikliğe bağlı olan faz dönüşümü esasına dayanır. Emülsiyon sabit sıcaklıkta sistemin hidrofilik-lipofilik dengesinin değiştirilmesiyle oluşur. Bu, surfaktan tek tabakalarının eğrilik yarıçapında ve emülsiyonun katastrofik faz dönüşümünde değişikliklere neden olur.

Örneğin, su damlacıklarının yağ fazında oluşumu, su fazının organik faza aşamalı olarak eklenmesiyle meydana gelir. Su fazının belirli bir eşik değeri üzerine çıkarılması, faz dönüşümüne yol açar.

Böylelikle, su içerisinde organik faz damlacıkları oluşur [32, 48]. Faz dönüşümü ayrıca elektrolitlerin, diğer surfaktanların ve alkollerin sisteme eklenmesiyle meydana gelebilir [49]. Literatürde bu metod genellikle EIP veya faz dönüşüm bileşimi (PIC), bazen de titrasyon olarak adlandırılır. Bu metod, çeşitli surfaktan karışımları içeren sistemlerde faz dönüşümü için gerekli olan su fazının minimum miktarını ölçmek ve su içinde yağ emülsiyonları hazırlamak için kullanılmaktadır. PIT emülsifikasyon metodunda olduğu gibi, EIP metoduyla en küçük damlacıkların oluşumu için sistemdeki yüzeylerarası gerilimin faz dönüşümüne bağlı olarak düşük olması gereklidir. Örneğin, prosesin ilk aşamasında bu sistem bir mikroemülsiyon veya bir likit kristalin lamellar fazdır [17, 23].

Surfaktan moleküllerinin hidrasyon derecesi ve bundan dolayı su fazına olan afiniteleri, mikroemülsiyondaki su/yağ oranının yükseltilmesiyle artar. Bu durum, mikroemülsiyonun instabilitesine ve NE'ye dönüşümüne yol açar. Surfaktanların difüzyonu, nano damlacıkların oluşumunda önemli bir rol oynar. Direkt emülsiyonlar bu metodla hazırlandığında, su fazı, organik fazda çok az çözünür olan bir surfaktan ve yağ karışımına eklenir. Su fazının eklenmesi, surfaktanın organik fazdan su fazına difüzyonuna neden olur. Bu durum, düşük yüzeylerarası gerilimde nanodamlacıkların oluşumunu sağlar [50]. EIP metodu NE lerin yalnızca etoksillenmiş surfaktanlarla değil diğer surfaktan tipleriyle de hazırlanmasını mümkün kılmaktadır [32].

c) Kendiliğinden Emülsifikasyon

Bu metod, oda sıcaklığında herhangi bir organik solvent kullanılmadan NE oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Forgirani ve arkadaşları, surfaktan ve yağ fazı karışımına kademeli olarak eklenen su fazının nazikçe karıştırılması ile kinetik açıdan stabil ve yaklaşık 50 nm damlacık boyutuna sahip NE formülasyonunun oluşturulabildiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada kullanan formülasyon bileşenleri farmasötik kullanım için uygun olmasa da yöntem farmasötik alanda NE geliştirilmesi için oldukça uygundur [51].

Kendiliğinden nanoemülsifikasyon prosesi, emulsifikasyon basamağında D-tipi iki tabakalı (bicontinuous) mikroemulsiyon oluşması nedeniyle faz dönüşümü ile ilişkilendirilmiştir. Sadurni ve arkadaşları, Cremophor® EL ve Miglyol® 812 karışımının kullanıldığı formülasyonun nanoemülsifikasyon prosesini küçük açılı X-ray tarayıcı ile incelemiş ve proses esnasında likit kristallerin oluştuğunu gözlemlemiştir [52].

Bu yöntem için gerekli olan optimum koşulların belirlenebilmesi için faz davranışları hakkında çalışmaların yapılması oldukça önemlidir. Kendiliğinden nanoemülsifikasyon yönteminde, formülasyonun oluşturulabilmesi temel olarak sistem bileşenlerinin oranı ve fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Ancak, bu metodla elde edilen NE'lerin yüksek kinetik enerjisi ve uzun süreli kolloidal stabilitesi olsa da termodinamik açıdan stabil olmadığı dikkate alınmalıdır [17].

Son yıllarda Anton ve Vandamme kendiliğinden nanoemülsifikasyon ve PIT metodlarının temel olarak sistemin surfaktan ve yağ fazlarının oranına bağlı olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada, solvent uzaklaştırma tekniği ile de NE formülasyonu hazırlanmış ve diğer iki yöntemle kıyasla bu yöntem ile elde edilen damlacıkların boyutunun daha büyük olduğu bulunmuştur.

Kendiliğinden nanoemülsifikasyon, NE oluşturmak için oldukça düşük maliyetli ve ilgi çekici bir yöntemdir [31]. Sabit sıcaklıkta çalışılan bu yöntemde kendiliğinden emülsifikasyon, su fazının içine düşük konsantrasyonda solvent içeren solüsyon eklenerek surfaktan kullanılmadan da gerçekleştirilebilir. Ouzo etkisi olarak bilinen bu durum, solventin oranına göre yağ damlacıklarının boyutunu belirler [17]. Örneğin, polar olmayan bir yağ içeren organik faz ve hidrofilik surfaktan ve/veya su ile karışabilen organik solvent yavaşça su fazına eklenebilir. Alternatif olarak, su fazı organik faza da eklenebilmektedir. Su ile karışabilen organik solvent tipik olarak etanol veya asetondur. Ancak bunlar yerine su ile karışabilen surfaktanlar da kullanılabilir. Metodun altında yatan fizikokimyasal mekanizma, su ile karışabilen bileşenlerin (solvent veya surfaktan) organik fazdan su fazına hareketidir. İlk olarak su fazı ve organik faz birbiriyle karıştırılır. Bu esnada, su ile karışabilen solvent/surfaktan karışımı organik fazdan su fazına doğru hareket ederek su ve yağ fazları arasında büyük bir tribölans yaratır.

Buna ek olarak, solvent veya surfaktanın su fazına doğru hızlı hareketi, su ve yağ arafazının genişlemesine neden olur ve yağ fazının su fazıyla çevrelenerek küçük damlacıklar oluşturmalarını sağlar. Küçük damlacık boyutu elde etmek için, genellikle yüksek oranda solvent ve surfaktana ihtiyaç duyulur. Kendiliğinden emülsifikasyon, lipofilik ilaçların enkapsüle edilmesi ve taşınmasında uygun olduğu için ilaç endüstrisi için oldukça uygundur. Bu metod, damlacık boyutu dikkate alınarak çoğunlukla kendiliğinden emülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler (SEDDS) veya kendiliğinden nanoemülsifiye olan ilaç taşıyıcı sistemler (SNEDDS) olarak belirtilir [15].

2.1.5 Nanoemülsiyonların Karakterizasyonu

2.1.5.1 Nanoemülsiyonların Morfolojisi

NE'lerin morfolojik özellikleri transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenebilir. SEM damlacıkların 3 boyutlu görüntülenmesini sağlayabilmektedir [53]. Formülasyonlar, uygun bir hızlandırıcı voltajda (genellikle 20 kV) ve değişik büyütme oranlarında incelenir. SEM mikroskobu, dispers fazın yüzey morfolojisinin iyi bir şekilde analiz edilebilmesini sağlamaktadır [54].

Görüntü analiz yazılımları yardımı ile (örneğin, Leica Imaging systems, Cambridge, UK) damlacıkların yüzey ve şekil morfolojileri otomatik olarak analiz edilebilir. TEM ile dispers fazın yüksek çözünürlüklü görüntüleri elde edilebilir [54]. TEM'den elde edilen mikrograflarla dijital görüntü işleme programları kullanılarak damlacık boyutu ve dağılımı kalitatif ölçümleri olarak ölçülebilir [55].

2.1.5.2 Damlacık Boyutu, Polidispersite ve Zeta Potansiyel

Foton koralesyon spektroskopisi olarak da adlandırılan dinamik ışık saçılım yöntemi, Brownian hareketi nedeniyle damlacıkların/partiküllerin saçılma şiddetindeki dalgalanmaları analiz etmek için kullanılır [56]. Bir partikül boyutu analiz cihazıyla, damlacık boyutu, polidispersite ve zeta potansiyeli analiz edilebilir.

Bu cihazla ayrıca polidispersite indeksi yani dinamik ışık saçılımının kümülatif analizinden elde edilen boyut dağılımı genişliği saptanır. Polidispersite indeksi, formülasyonun kalitesini veya homojenitesini göstermektedir [57].

Eşdeğer kürelerin hacmi (DN%) ve ortalama hacim dağılımı (toplam ortalama çap) olarak ifade edilen lazer difraksiyon partikül boyutunu ölçmek için kullanılan diğer bir yöntemdir. Partikül boyutu hacim baz alınarak hesaplanır. Bu sistemlerin kullanılması ile damlacık polidispersitenin kabaca analizi yapılabilir. Uniformite (medyan noktası çevresinde damlacık dağılımı ne kadar simetrik) ve aralığı ölçülerek analiz edilir. Aralık ne kadar küçük olursa, damlacık dağılımı o kadar dar anlamına gelmektedir [16].

Zeta potansiyel, sistemin stabilitesiyle ilgili bilgi veren, kolloidal sistemlerde dispersiyon ortamı ile dispers fazın çevresini saran sıvı tabaka arasındaki potansiyel farkıdır. Bu değer komşu ve aynı yükte olan iki partikülün birbirini itme derecesini gösterir. Küçük partiküllerin yüksek zeta potansiyeli olup, agregasyona karşı dayanıklıdır.

Eğer zeta potansiyeli düşük ise, çekme kuvveti itme kuvvetinden daha fazla olur ve dispersiyon bozularak flokülasyon meydana gelir. Genel olarak, zeta potansiyeli 0'dan ± 30 mV a kadar olan sistemler stabil değildir. Zeta potansiyelinin ± 30 'dan büyük olması istenmektedir. Formülasyondaki surfaktanların cinsi, elektrolit konsantrasyonu, pH gibi faktörler zeta potansiyelini etkilemektedir [58].

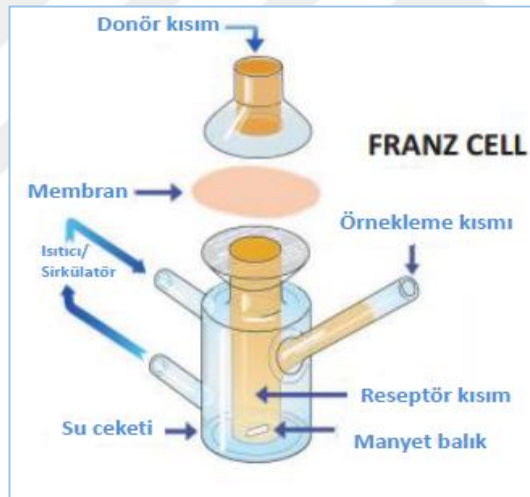
2.1.5.3 Viskozite Tespiti

Formülasyonların viskozitesi, viskozimetre cihazı ile ölçülür. Farklı ekipmanlar ve metodlar NE taşıyıcılarının reolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Viskozitedeki değişimin tayin edilmesi, sıvı ve yarı katı sistemler için stabilitenin kontrolünde önemli bir parametredir. NE'lerin viskozitesi, surfaktan, su ve yağ bileşenlerine ve bileşenlerin konsantrasyonlarına bağlı bir özelliktir. Su miktarının artırılmasıyla viskozite azalırken, surfaktan ve kosurfaktan miktarlarının azaltılmasıyla yüzeyler arası gerilim ve viskozite artar. Viskozite formülasyondan ilaç salınımı ve formülasyon stabilitesi için oldukça önemlidir. Su içinde yağ NE'lerinin viskozitesi, yağ içinde su NE'lerinden daha düşüktür.

Bu nedenle ilaç salınımının su içinde yağ tipi formülasyonlardan daha hızlı gerçekleşmesi beklenir. Ayrıca cilde uygulanan preparatlarda cilt yüzeyinden temizlemek de daha kolaydır [16].

2.1.5.4 İn Vitro Deri Permeasyon Çalışmaları

Franz difüzyon hücreleri, transdermal kullanılan NE'ler için ilaç salım profilini belirlemede kullanılır. Formülasyonun derinin derin kısımlarına penetrasyonu ise konfokal taramalı lazer mikroskopla izlenebilir. İn vitro ilaç salım çalışmalarında, formülasyonun bir miktarın Franz difüzyon hücrelerinin donör kompartmanında disperse edilir. Bu hücrelerin donör ve reseptör kompartmanları arasına yerleştirilen membran bariyer görevi görür. Daha sonra uygun bir ortamda (genellikle pH= 7,4 PBS) ve sıcaklıkta ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) olacak şekilde manyetik karıştırıcıda 100 rpm hızda karıştırılarak enkapsüle olan ilaç miktarı takip edilir (Şekil 2. 3).



Şekil 2. 3 Franz difüzyon hücresinin şematik gösterimi [59]

Dispersiyonun 1 ml'si salım ortamından alınarak, yerine taze salım ortamından eşit miktarda ilave edilir. Alınan dispersiyon 0,22-50 μm filtrelerden süzülür ve UV spektrofotometre kullanılarak salınan ilaç miktarı analiz edilir [60]. Alternatif olarak, popüler bir metod olan ex-vivo salım çalışması da difüzyon hücreleri kullanılarak yapılabilir. Kulak veya abdomenden alınan deri, altında bulunan yağ ve kıkırdak dokulardan temizlenir. Uygun boyuttaki deri, daha önce reseptör faz ile doldurulmuş difüzyon hücrelerinin üzerine yerleştirilir. Daha sonra formülasyon, derinin dorsal yüzeyine uygulanır ve işlem başlatılır.

Belirli zaman aralıklarında reseptör fazdan örnekler alınır ve yerine eşdeğer miktarda taze salım ortamı ilave edilir. Alınan örneklerdeki madde miktarı, HPLC`de veya UV spektrofotometrede analiz edilir [61, 62]. İn vitro salım çalışmalarında deri yerine rejenere selüloz gibi yarı-geçirgen membranlar kullanılabilir [63, 64].

İn vivo salım çalışmaları, diğer bir değişle dermatofarmakokinetik, formülasyonun canlı hayvana uygulanması ile yürütülür. Kan örnekleri belirli zaman aralıklarında alınarak santrifüj edilir. Plazmadaki ilaç içeriği HPLC kullanılarak tayin edilir. İn vivo ve in vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlar ekstrapole edilerek formülasyonun biyoyararlanımı değerlendirilir [16].

2.1.6 Nanoemülsiyonların Stabilitesi

Brownian hareketi sayesinde difüzyon hızı, yer çekiminin indüklediği kremalaşma veya sedimentasyon hızından daha yüksek olmaktadır. Böylelikle, NE'lerin küçük damlacık boyutu, sedimentasyona veya kremalaşmaya karşı dayanıklılık sağlar.

Emülsiyon polidispersitesi ve küçük ve büyük damlacıklar arasındaki çözünürlük farkı nedeniyle ortaya çıkan Ostwald olgunlaşması veya moleküler difüzyon, NE'lerin destabilizasyonunda başlıca mekanizmadır [23].

The Lifshitz –Slezov [65] and Wagner (C. Wagner, Theorie der Alterung von Niederschlagen durch Umlosen [66] (LSW) teorisi, Ostwald olgunlaşma hızının eğimi ile damlacık yarıçapının kübü (r^3) ve zaman (t) arasındaki lineer ilişkiyi tahmin eder. LSW teorisi, disperse faz damlacıklarının küresel olduğunu, damlacıklar arası mesafenin, damlacık yarıçapından daha büyük olduğunu ve kinetiğin devamlı fazdaki disperse faz damlacıklarının moleküler difüzyonu ile kontrol edildiğini varsaymaktadır.

Bu teoriye göre, su içinde yağ emülsiyonlarında Ostwald olgunlaşma hızı, su fazındaki yağın çözünürlüğü ile doğrudan orantılıdır. Taylor, Ostwald olgunlaşmasının, su içerisindeki yağ damlacıklarının termodinamiklerini tahmin etmede bir araç olarak kullanılabileceğini önermiştir [67]. Izquierdo ve ark.ları, deneysel Ostwald olgunlaşma hızı değerlerini, LSW teorisine göre hesaplanan teorik değerlerden daha yüksek elde etmişlerdir [68].

Bu farklılık, teoride dikkate alınmayan su fazındaki mikroemülsiyon damlacıklarının ve/veya misellerin varlığı nedeniyle meydana gelen yağ transferi, damlacıkların Brownian hareketinde artış ve yüzeyler arası Gibbs elastikiyetinin düşürülmesi gibi nedenlere dayandırılabilir. Hesaplanan değerlerden yaklaşık 3 kat daha büyük deneysel Ostwald olgunlaşma hızı değerleri, Courrier ve ark.ları tarafından çalışılan florlanmış surfaktanlarla stabilize edilen yağ içinde su NE'lerinde rapor edilmiştir [69].

Ostwald olgunlaşma süreci, düşük miktarda çözünürlüğü düşük ikinci bir yağın su fazına eklenmesiyle azaltılabilir [23, 70]. Literatürde, etoksillenmiş bir surfaktan sistemi için aynı alkil zinciri uzunluğu ve primer surfaktandan daha yüksek etoksilasyon derecesine sahip ikinci bir surfaktan eklenmesiyle Ostwald olgunlaşma hızının azaltılabileceği bildirilmiştir [70].

2.1.7 Nanoemülsiyonların Kullanım Alanları

2.1.7.1 Nanoemülsiyonların Kozmetikte Kullanımı

NE'ler kozmetiklerin kontrollü taşınmasında ve aktif maddelerin belirli cilt tabakalarında optimize edilmiş dispersiyonlarının oluşturulmasında giderek artan öneme sahiptir. Lipofilik çekirdeği nedeniyle NE'ler lipofilik maddelerin taşınmasında lipozomlardan daha uygundur. Lipozomlara benzer olarak, formülasyonun cilt penetrasyonuna yardımcı olur ve bu sayede ciltteki konsantrasyonunu artırır. NE'lerin küçük damlacık boyutu ve yüksek yüzey alanına sahip olması sayesinde aktif maddelerin efektif transportunu sağlaması bir diğer avantajıdır. Ayrıca, NE'lerin kendi biyoaktif etkileri nedeniyle de giderek önem kazanmaktadır. NE'ler transepidermal su kaybını (TEWL) azaltarak cildin dayanıklılığını arttırabilir. Bu sistemler, makroemülsiyonlarda görülen kremalaşma, sedimentasyon, flokülasyon veya koalesans gibi stabilite problemleri göstermediğinden kozmetiklerde kullanımı uygundur.

İritasyona neden olma ihtimali olan surfaktanların formülasyona ilave edilmesi çoğunlukla yüksek enerjili ekipmanların kullanımı ile elimine edilebilir. Kemira ve TRI-K şirketlerinin geliştirdikleri yeni nano tabanlı jel cilt bakım ürünlerinin etkilerini arttırmayı hedeflemektedir.

Kemira NanoGel kolay formülasyonu ve nanoteknolojik özelliklerinin getirdiği birtakım avantajlarla benzersiz bir NE taşıyıcı sistemdir. NanoGel, su içinde yağ formunda olan kullanımı kolay submikron emülsiyonların basit bir proses ile hazırlanmalarını sağlar. Bu formülasyon özellikle TEWL'in azaltılması, cildin yenilenmesi ve aktif maddelerin penetrasyonunun artırılması için uygundur. Bu özellikler başlıca güneşten koruma ürünleri, nemlendiriciler ve yaşlanma karşıtı ürünlerde önem kazanmaktadır. NanoGel teknolojisine sahip ürünler halihazırda pazarda bulunmaktadır [14, 18].

2.1.7.2 Nanoemülsiyonların Antimikrobiyal Olarak Kullanımı

Antimikrobiyal NE'ler su içinde yağ tipi olup damlacık boyutları 200-600 nm arasında değişmektedir. Formülasyon, yağ ve su fazları ile stabilizasyonda kullanılan surfaktanlar ve alkolden oluşur.

NE formundaki antimikrobiyaller, bakterilere (örneğin, E.coli, Salmonella, S. Aureus), zarflı virüslerin (örn. HIV, Herpes simplex), mantar (örneğin, Candida, dermatofitler) ve sporlara (örneğin, şarbon) etki edebilir ve geniş bir spektruma sahiptirler. NE partiküller termodinamik olarak lipid taşıyan organizmalarla birleşmeye hedeflenir. Bu birleşme, katyonik damlacık ile patojenin üzerindeki anyonik yük arasındaki elektrostatik çekimi ile katalizlenir. Yeteri kadar damlacık patojenle birleştiğinde, emülsiyondaki enerjinin bir bölümü salınır. Salınan etken madde ve enerji, patojenin lipid membranını destabilize ederek hücrenin lizisine ve ölümüne neden olur. Sporların da olduğu vakalarda, germinasyonu arttıran ek maddeler emülsiyon formülasyonuna dahil edilir. Germinasyon olayı gerçekleşmeye başladığı zaman, germinasyona uğrayan sporlar NE'nin antimikrobiyal aktivitesine hassas hale gelmeye başlar. NE'lerin çok önemli bir özelliği de mikroplara selektif toksik özellik gösterdiği konsantrasyonlarda, cilt ve mukoza membranlarını irite etmemesidir. NE'nin güvenlik sınırı, damlacıkların ihtiva ettiği deterjan miktarının düşük olması sayesinde, sağlıklı hücrelere zarar vermeden, hedeflendirilmiş mikrobun destabilize edilmesi için yeterli enerji ve surfaktan miktarına sahiptir. Bunun sonucunda NE formülasyonu, sistemik antimikrobiyal aktivitenin oluşturduğu etkiyi topikal kullanımda da elde edebilme imkanı sağlar [14].

2.1.7.3 Nanoemülsiyonların Biyoterörizm Saldırılarında Profilaktik Olarak Kullanımı

NE'lerin antimikrobiyal aktivitesinden yola çıkarak, ebola veya şarbon gibi biyosaldırı patojenlerine karşı profilaktik tedavi amacıyla kullanımları üzerine çalışmalar başlatılmıştır. Geniş spektrumlu bir NE, Amerikan ordusunda (RestOps) şarbon sporlarına karşı dekontaminasyon için 1999 yılında denenmiştir. Bu deney 2001 yılının mart ayında RestOps tarafından kimyasal bir dekontaminasyon ajanı olarak tekrarlanmıştır ve bütün testler başarılı bulunmuştur. NE teknolojisi kangren, kontamine yaralar ve Clostridium botulinum sporlarında da denenmiştir. NE teknolojisi, krem, köpük, sıvı veya sprey formunda hazırlanıp çeşitli malzemelerin dekontaminasyonunda kullanılabilir. Örnek olarak piyasada olan NANOSTAT™ (Nanobio Corp.) verilebilir [16].

2.1.7.4 Nanoemülsiyonların Mukozal Aşı Olarak Kullanımı

NE'ler, immun cevabın oluşturulmasında rekombinant proteinlerin veya inaktive edilmiş organizmaların mukozal yüzeye iletilmesi amacıyla kullanılmaktadır. İlk uygulamalar, klinik çalışmaları devam eden influenza ve HIV aşılarında yapılmıştır. NE'ler adjuvan olarak proteinlerin mukozal yüzeylere uygulanmasını sağlar ve antijen sunan hücreler tarafından alımını kolaylaştırır. Bu durum hücresel immunitenin yanı sıra, sistemik ve mukozal immun cevabın, bununla bağıntılı olarak spesifik IgG ve IgA antikorlarının önemli derecede artmasını sağlar. Influenza ile alakalı olarak yapılan ilk çalışmalarda, virüs içerikli emülsiyonun tek mukozal uygulanmasında hayvanların korunabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, araştırma NE içindeki rekombinant gp120'ye maruz kalan hayvanların nazal mukozasının HIV'e karşı anlamlı ölçüde cevap geliştirdiğini saptanmıştır. Ek çalışmalar, Hepatit B ve şarbonu da kapsayan diğer aşılar için hayvan deneyleri ile devam etmektedir. Michigan Üniversitesi bu teknolojiyi NanoBio® adı altında lisanslamıştır. Epidemiyolojik ve deneysel datalar, ilk dönem HIV-1 enfeksiyonunun kontrolünde nötralize edici antikorların ve hücresel cevabın arttırılabildiğini göstermiştir [71].

Hepatit B virüs enfeksiyonu, güvenli ve etkili profilaktik aşıların mevcut olmasına rağmen, önemli küresel bir sağlık sorunu olarak kalmaktadır. Bu aşıların buzdolabında saklanması ve üç kez aşılama yapılması gerekliliği, gelişen ülkelerde kullanımlarını sınırlamaktadır.

Yeni bir NE adjuvan (HBsAg-NE) içerisindeki rekombinant hepatit B yüzey antijeninden (HBsAg) oluşan nazal hepatit B aşısı, daha az uygulama ile etkili olabilmektedir. Çoklu hayvan modellerinde yürütülen kapsamlı prelinik toksikoloji değerlendirme, HBsAg-NE aşısının güvenli ve iyi tolere edilebildiğini göstermektedir. Çalışma sonuçları, HBsAg-NE ile iğnesiz nazal immünizasyonun güvenli ve etkili bir hepatit B aşısı olabildiğini veya paranteral hepatit B aşıları için alternatif güçlendirici bir uygulama sağladığını ispatlamaktadır. Bu aşı Th1 ile bağlantılı hücresel immüniteyi indüklemektedir. Ayrıca, kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalara terapötik fayda sağlayabilmektedir. Bu aşı formülasyonunun yüksek sıcaklıklardaki uzun süreli stabilitesi, taşıma sırasında terapötik etkinliğinde bir kayıp yaşanmadan kullanılabilmesini sağlamaktadır [72].

2.1.7.5 Nanoemülsiyonların Hücre Kültürü Teknolojisinde Kullanımı

Hücre kültürü, in vitro çalışmalarda, antikor veya rekombinant protein gibi biyolojik maddelerin oluşturulmasında kullanılmaktadır. Hücre büyümesini optimize etmek için, hücre kültürü besiyeri tanımlanan bir dizi molekül veya kan serumu ile desteklenebilir. Özellikle yağda çözünen maddelerin hücre tarafından alınmasını sağlayacak uygun bir besiyeri ortamı sağlamak yakın zamana kadar oldukça zor bir durumdur.

Besiyerlerinden hücreye lipofilik maddelerin absorpsiyonu oldukça düşüktü. NE'ler, yağda çözünen maddelerin memeli hücre kültürlerine iletilmesi için yeni bir yol teşkil etmektedir. Bu NE sistemi fosfolipidlerle stabilize edilmektedir. Bu NE'ler transparandır ve 0,1 mm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilebilir. Sistemdeki NE damlacıkları, hücreler tarafından kolayca alınabilir. NE'lerin hücre kültürü teknolojisinde kullanılmalarının avantajları, hücre kültüründe yağda çözünen bileşenlerin biyoyararlanımının artırılması, kültür hücrelerinin büyüme ve hayatta kalabilirliklerinin artırılması ve lipofilik ilaçların toksisite çalışmalarının hücre kültüründe yapılabilmesine olanak sağlamasıdır [14].

2.1.7.6 İlaç Hedeflendirmede Nanoemülsiyonların Kullanımı

NE'lerin diğer ilgi çeken bir uygulama alanı da kontrollü ilaç taşınması ve hedeflendirmedir [17]. Submikron boyuttaki damlacıklar sayesinde tümörlü dokuya kolayca hedeflendirme gerçekleştirilebilir.

NE'ler genel olarak suda çözünmeyen ilaçların uygulanması için bir taşıyıcı sistem olarak görülse de son yıllarda bu sistemlerin birtakım antikanser ilaçlar, fotosensitizörler, nötron yakalama terapisi ajanları veya diyagnostik ilaçlar için de oldukça uygun kolloidal taşıyıcılar oldukları anlaşılmıştır. Manyetik NE'lerin geliştirilmesi kanser tedavisi için önemli bir adımdır. Bu sistem, Foscan® benzeri fotosensitizörlerin cildin derin tabakalarına taşınması için uygundur. Bu sayede yeterli serbest radikal oluşumu için hipertermi indüklenir. Bu metodoloji kanserin fotodinamik terapisi için kullanılabilir [73].

2.1.7.7 Nanoemülsiyonların İntranazal Yoldan Kullanımları

İntranazal ilaç taşıyıcı sistem, günümüzde parenteral ve oral yolların yerine ilaç uygulamasında kullanılabilecek güvenilir bir yol olarak görülmektedir. Nazal mukoza sistemik ilaçların uygulanabilmesi için oldukça uygun bir ortamdır. Ayrıca hedeflenen bölgeye ilacın ulaşmasında görülen engeller bu yolla elimine edilebilmektedir [74]. Bu yol ayrıca hasta için girişimsel olmayan, ağrısız ve iyi tolere edilebilir bir yoldur. Nazal boşluk, bölgedeki düşük enzim aktivitesi, immunoaktif bölgelere yüksek erişebilirlik ve orta derecede geçirgen epiteli nedeniyle oldukça etkili bir bölgedir [75]. Özellikle yüksek molekül ağırlıklı hidrofilik ilaçların beyne hedeflendirilmesinde çeşitli problemler vardır. Bunun sebebi, sistemik dolaşımla kan beyin bariyerini birbirinden ayıran geçirgen olmayan yapıdaki endotel tabakasıdır [76].

Nazal mukozada bulunan olfaktor bölge, burun ile beynin arasında direkt bir bağlantı sağlar. İlaç yüklü NE'lerin kullanımıyla, Alzheimer, depresyon, şizofreni, migren, menenjit ve Parkinson hastalıkları gibi durumlar tedavi edilebilir [77, 78]. Risperidon'un NE formülasyonu beyne hedeflendirmek amacıyla intranazal yolla uygulanmış ve sonuçlar intranazal uygulamanın intravenoz uygulamadan daha etkili olduğunu göstermiştir [78].

NE'lerin intranazal ilaç taşıyıcı sistem olarak diğer bir kullanım alanı da aşılardır. Mukozal antijenin uygulanmasıyla immünite sağlanabilmektedir. Şu anda ilk intranazal aşı piyasada bulunmaktadır [79].

2.1.7.8 Nanoemülsiyonların Parenteral Yoldan Kullanımları

Parenteral kullanım düşük biyoyararlanımı ve dar terapötik indeksi olan ilaçların vücuda tatbik edilebilmesi için en çok tercih edilen ve en etkili yoldur. NE'lerin lipofilik ilaçları yüksek oranda çözebilme kapasitesi ve ilaçları hidroliz ve enzimatik degradasyondan koruma yeteneği, bu sistemleri parenteral yoldan kullanım için ideal taşıyıcılar yapar. Ayrıca, bu emülsiyonlar içerdikleri ilacın uzun bir süre boyunca kontrollü ve sürekli salımını sağlayabildikleri için tedavi boyunca dozaj ve enjeksiyon sıklığını azaltabilirler. Buna ilaveten, geniş yüzey alanına sahip serbest enerjili NE'lerde, flokülasyon, sedimentasyon ve kremlaşma problemlerinin olmayışı, daha büyük damlacık boyutlu emülsiyonlara kıyasla görünür avantajlar sunar. NE damlacıklarının geniş yüzey alanı, spesifik bölgelere hedeflendirmeyeyle birlikte etken maddenin transportu ve iletilmesine olumlu etki yapar.

Bu nedenle, NE bazlı paranteral taşıyıcılar için önemli klinik ve prelinik çalışmalar yürütülmektedir [80]. Yapılan bir çalışmada talidomidin 25 mg gibi çok az bir dozunun NE formunda parenteral kullanımının terapötik olduğu gösterilmiştir [81]. Klorambusil, yumurtalık ve göğüs kanserine karşı kullanılan lipofilik bir antikanser etken maddedir. Parenteral NE formülasyonu yüksek enerji ultrasonikasyon metodu ile hazırlanarak farmakokinetiğine ve antikanser aktivitesine bakılmıştır. Farelerde kolon adenokarsinomu bu NE formülasyonu ile tedavisi edildiğinde, etken maddenin sulu çözeltisine kıyasla çok daha iyi tümör supresyonu sağladığı görülmüştür [81].

2.1.7.9 Nanoemülsiyonların Transdermal Yoldan Kullanımları

Transdermal yoldan ilaç uygulanması pek çok klinik durum için uygun olduğundan bu alanda büyük bir ilgi görmektedir [82, 83]. Transdermal yol, uzun süre kontrollü ilaç taşıma, paranteral yoldan ilaç uygulamada mümkün olmayan hastanın ilacı kendisinin uygulayabilmesi, ilaç uygulamasının istenildiği an kesilebilmesi, ilacın oral alımında oluşan irritasyonun elimine edilebilmesi gibi birçok avantaja sahiptir.

Ancak, transdermal kullanımda derinin bariyer fonksiyonu nedeniyle biyoaktiflerin penetrasyonlarının sınırlı olması başlıca dezavantajdır.

İlaçların deriden penetrasyonunda 3 yol vardır. Bunlar saç folikülleri, ter bezleri ve ilaçların biyoyararlanımını sınırlandıran ve yüksek miktarda absorpsiyonunu engelleyen stratum korneumdan direkt geçiştir.

Yüksek bir farmakokinetik profili elde etmek ve ilaç hedeflendirme sağlayabilmek için, cilt bariyerlerinin geçilebilmesi gerekmektedir. Bunun yanında, lokal kullanımda ilacın kutanöz lenf ve kan damarlarına geçmesi kontrol edilmelidir. Nano boyutta emülsiyonlar, cilt porlarından kolayca penetre olabilir ve sistemik sirkülasyona efektif bir şekilde taşınabilir [84].

Kafein farklı kanser tiplerinin tedavisinde oral yoldan uygulama için kullanılmıştır. Kafeinin yağ içinde su NE'leri transdermal yoldan kullanım için geliştirilmiştir. İn vitro cilt permeasyon profilleri karşılaştırıldığında, NE'ye yüklenmiş kafeinin, sulu çözeltisine göre farkedilir şekilde permeabilitesinin yüksek olduğu saptanmıştır [85].

Transdermal NE ilaç taşıyıcı sistemlerin, ilaçların terapötik etkisini arttırmakla beraber yan etkilerini elimine edebilmesi, ilaç taşıyıcı sistem araştırmalarında önemli bir alan sunmaktadır.

Buna ilaveten, sistemin uzun süre stabil şekilde saklanabilmesi, düşük üretim maliyeti, termodinamik stabilitesi, organik çözücü içermemesi ve iyi üretim fizibilitesi önemli avantajlarıdır. Ayrıca, bu sistemler ilaçların plazma konsantrasyon profillerinin ve biyoyararlanımlarının tekrarlanabilir olmasını sağlar [84]. NE'ler, emülsiyonlar ve jeller gibi konvansiyonel pek çok ilacın transdermal permeasyonunu arttırmıştır [86-88].

2.1.7.10 Nanoemülsiyonların Pulmoner Yoldan Kullanımları

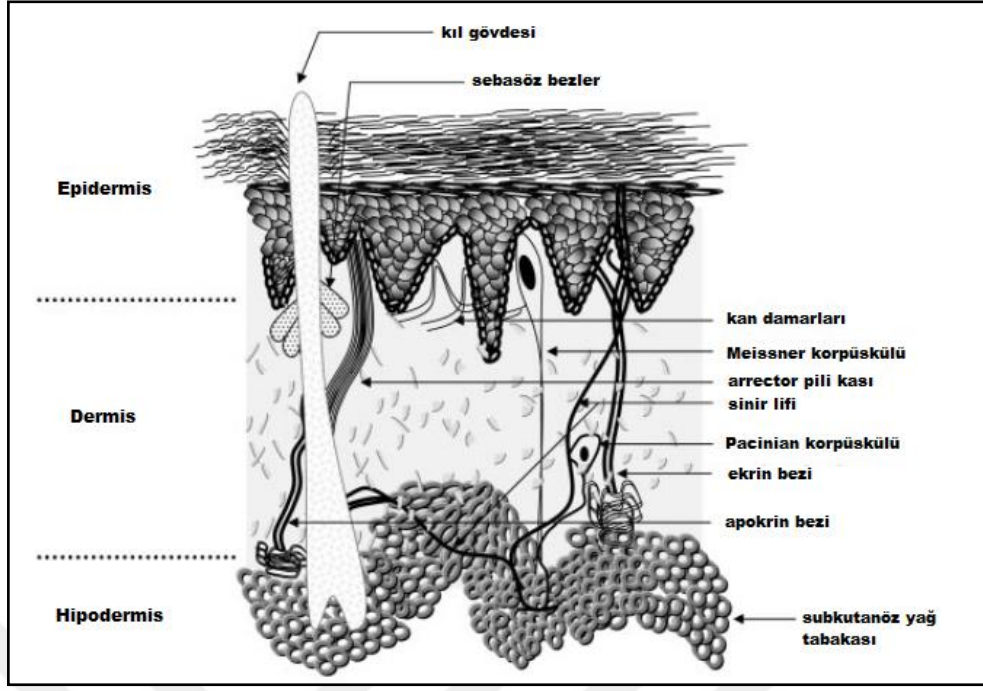
Akciğer, inhalasyon aerosoller ile noninvaziv olarak uygulamaya imkân vermesi, ilaçların ilk geçiş etkisine uğramadan dolaşıma katılmasını sağlaması, respiratuar hastalıkların etki bölgesine ilaç hedeflendirme yapabilmesi, geniş yüzey alanı ile lokal ilaçların etki bölgesi olması ve sistemik ilaçların absorpsiyonunu sağlaması gibi nedenlerle ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça uygun ve dikkat çeken bir bölgedir.

Kolloidal taşıyıcılar (örneğin, nanotaşıyıcı sistemler), alveoller arasında ilacın uniform dağılım sağlayabilme, etken maddenin sudaki çözünürlüğünü arttırabilme, sürekli ilaç salınımı sağlamasıyla doz sıklığını azaltabilme, iyi hasta uyuncu gösterme, ilaçların yan etkilerini azaltabilme ve ilacın iç doku hücrelerine dağılımını arttırabilme gibi birçok avantaja sahiptir. Son zamanlara kadar submikron emülsiyon sistemlerinin pulmoner ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanımıyla ilgili pek fazla çalışma yapılmamıştır [89]. Bivas-Benita ve ark.ları katyonik submikron emülsiyonların, deoksiribonukleik asit aşılarının akciğere uygulanmasında uygun bir taşıyıcı olabileceğini göstermişlerdir [90].

Bu nedenle, submikron emulsiyonların nebulizasyonu yeni ve gelecek vadeden bir alandır. Öte yandan formülasyonda kullanılan surfaktan ve yağların akciğer alveolleri üzerindeki muhtemel yan etkileri (akciğer surfaktanları ile etkileşim) nedeniyle akciğer fonksiyonlarına zarar vermemesi için başarılı bir formülasyon tasarımı yapılmalıdır. Triklorotrifloroetan ile formülize edilmiş lesitin ile stabilize salbutamol mikroemulsiyonu basınçlı bir aerosol sistem olarak pulmoner yoldan tasarlanmıştır [91].

2.2 Deri ve Yapısı

Deri dış çevre ile vücut arasında bariyer sağlayan ve vücut ağırlığının % 16'sını oluşturan insan vücudunun en geniş organıdır [92]. Ortalama bir erişkin derisi yaklaşık olarak 170-200 cm² genişlikte ve 4-5 kg ağırlıktadır [93]. Derinin iç organları fiziksel ve kimyasal travmadan koruma, ultraviyole ışınlarından koruma, mikroorganizma girişini engelleme, transepidermal su ve elektrolit kaybını engelleme gibi pek çok işlevsel göreve sahiptir [94]. Deri epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere 3 ana katmandan oluşmaktadır [95] (Şekil 2. 4).



Şekil 2. 4 Derinin yapısı [96]

Epidermis, dış çevre ile ilişkide olan en dış katman, dermis, epidermis ve hipodermis arasındaki katman ve hipodermis dermisin hemen altında yer alan ve yağ hücrelerini içeren katmandır [93].

Her bir katman aynı zamanda ilaç ve toksinler için potansiyel etki alanları içermektedir [97]. Epidermis ve dermis, dermal papilla ve epidermal sırtlardan oluşmuş ve özelleşmiş bir yapı olan bazal membran aracılığıyla ilişki içerisindedir. Bazal membran iki kompartmanı fiziksel olarak ayırmakta ve dinamik bir arayüz oluşturmaktadır [98]. Dermal papillalar ve epidermal sırtların bağlantısı bazal membran sayesinde işlevsel duruma getirilmektedir.

Bu bağlantı madde alışverişi ve dış çevre ile iç organlar arasındaki ilişkinin devamı için gereklidir [99]. Bazal membrandaki proteinlerin ve glikoproteinlerin asıl görevi epidermis ve dermis arasındaki adezyonu sağlamaktır [100].

2.2.1 Derinin Fonksiyonları

Deri ilk olarak sabit vücut sıcaklığının korunmasına yardım etmektedir. 23-30°C aralığındaki çevre sıcaklığında vücut sıcaklığı yükselmeye başladığı zaman, sıcaklık kan damarlarının dilatasyonu ile kaybedilebilir.

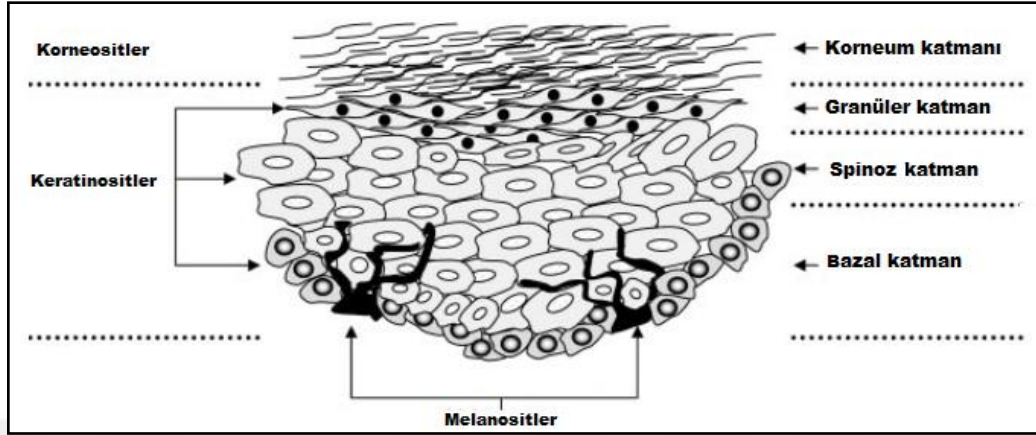
Bu olay genel olarak cilt kızarması olarak bilinen bir duruma yol açar. 30°C'nin üzerinde, terleme fonksiyonu başlar ve buharlaşmayla serinletici etki meydana gelir. İkinci ve çok önemli bir fonksiyonu da vücudun su içeriğini korumaktır. Derinin en dış tabakalarında yer alan lipidler, vücuttan aşırı su kaybını önleyici bir bariyer sağlamaktadır. Eğer bu lipidler deterjanlar gibi faktörlerle cilt yüzeyinden kaybolurlarsa, ciltten su kaybı artar ve kuru deri olarak bilinen durum ortaya çıkar. Derinin üçüncü özelliği de güneş ışığına maruziyet sonucunda ortaya çıkan etkilerden, vücudu korumaya yardım etmektir. Vücudun güneş ışınlarına maruziyeti derideki pigmentler ile kontrol edilir. Bu durum güneş ışınlarına karşı daha iyi bir korunma olanağı sağlayan ultraviyole (UV) maruziyete doğrudan bir yanıttır. Deri ayrıca hem kimyasal hem de mikrobiyal etkilerden korunmayı sağlar. Cilt yüzeyi asit manto olarak bilinen bir filmle kaplıdır. Asit manto, sekresyon aracılığıyla ter ve sebasöz bezleri tarafından oluşturulur. Asit manto test edilen vücut bölgesine bağlı olarak, genellikle, 4,5-6,5 aralığında bir pH'ya sahiptir. Bu manto deriye korunma, kimyasal savunma, detoksifikasyon ve bakteriyostatik fonksiyonlar verir. Asit mantonun pH'sındaki ani değişiklikler, istenmeyen bakteriyel yayılmaya, hassaslaşmaya ve çeşitli cilt dermatitlerine yol açar. Son olarak deri, mekanik strese karşı dayanıklılık sağlar. En dıştaki boynuzsu tabaka, dışarıdan gelen mekanik hasara ve basınca karşı vücudu dıştan sert bir örtü gibi kaplayarak ilk savunmayı sağlar [101-103].

2.2.2 Derinin Fizyolojisi

2.2.2.1 Epidermis

Derinin en dış katmanı olan epidermis tabakasının kalınlığı en ince olan bölgede 0,5 mm ve en kalın olan bölgede 4-6 mm olarak değişmektedir [93]. Epidermisin yaklaşık %95'i keratinosit hücrelerinden oluşmakla birlikte; bu tabakada melanositler, Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri ve lenfositler de bulunmaktadır [92, 104].

Epiderminin yapısı ırklar arasında birkaç farklılık göstermesi haricinde oldukça benzerlik gösterir. Epidermis bazal katman, spinoz katman, granüler katman, lusidum katmanı ve korneum katmanı olmak üzere beş farklı tabakadan oluşmaktadır [105] (Şekil 2. 5).



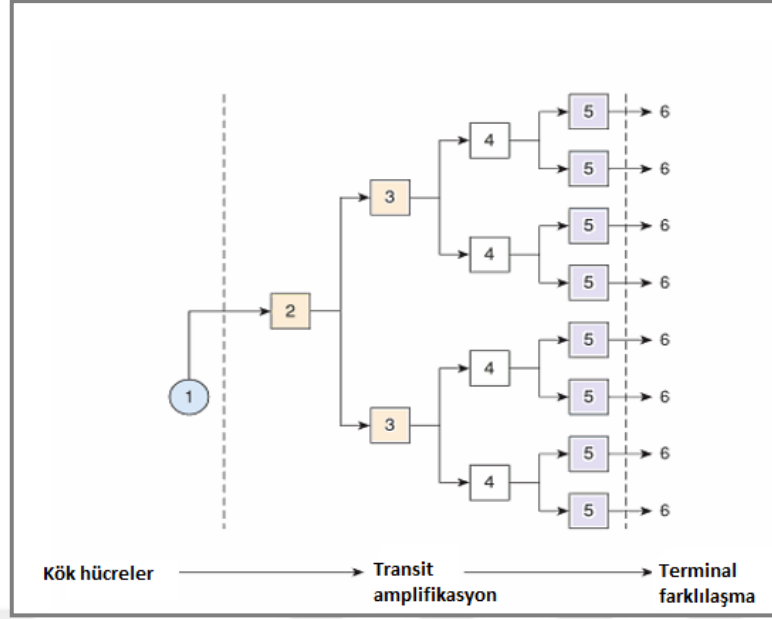
Şekil 2. 5 Epiderminin katmanları [103]

a) Bazal Katman (Stratum Germinativum, Taban Katman)

Epiderminin en derin tabakası olan bazal tabakadaki hücreler devamlı olarak yenilenme yeteneğine sahiptir. Bazal tabaka, bazal membrana (dermo-epidermal membran) protein yapısındaki hemidesmozomlar; spinoz katman hücrelerine ise desmozomlar aracılığı ile tutunan tek sıra kolumnar bazal hücrelerden oluşmaktadır [104, 105]. Hücreler hızlı bölünme nedeniyle yoğun metabolik aktivite ve yüksek/sitoplazma oranı göstermektedir [104].

Bazal katman hücreleri, granüler hücrelere dönüşmek ve sonuçta korneum katmanının parçası olmak amacıyla yukarıya doğru göç ederler. Korneum katmanına ulaştıktan sonra buradan dökülürler [106] (Şekil 2. 6). Bazal katmandan korneum katmanına göç süresinin yaklaşık 13 gün sürdüğü tahmin edilmektedir.

Cilt yüzeyinde kayıp (deskuamasyon) meydana gelmeden önce tamamen keratinize olmuş korneum katmanında bir 13 gün daha harcanır. Bu nedenle ortalama olarak epidermis her 26 günde bir yenilenmektedir.



Şekil 2. 6 Bazal tabakada hücre oluşumunun şematik gösterimi [104]

Ayrıca bu katmanda bulunan özelleşmiş diğer hücreler melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleridir. Bazal katman keratinositlerinin arasına yerleşmiş Melanositler tüm hücre popülasyonunun %5-10'unu oluşturmaktadır [107]. Sayıları vücut alanına göre değişkenlik göstermekle birlikte keratinosit sayısı ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Her 5-10 keratinosit hücrelerine oranla 1 melanosit bulunduğu tespit edilmiştir [93].

Melanositlerin embriyolojik kökeni keratinositlerden farklı olarak sinir sisteminin gelişeceği nöral kristadır. Embriyo gelişme sürecinde iken melanositler nöral kristadan deri yüzeyine doğru göç ederler. Melanositler, sitoplazmik membrandan başlayan ve bazal ve spinoz katman keratinositlerinin infiltre eden dendrit denilen ince, uzun uzantılara sahip çok özel bir hücre yapısına sahiptir. Melanositler, deriyi UV radyasyon ve serbest radikallerden koruyan melanini (eumelanin ve phaeomelanin) taşıyan melanozomları üretirler. Bu aşamada melanositler, dendritik uzantıları sayesinde melanozomu çevresindeki keratinositlere dağıtır. Keratinositlerdeki çekirdek etrafına yerleşen melanozomlar adeta bir şemsiye gibi UV ışınlarına karşı koruma bariyeri oluşturur. Melanin üretimi için gerekli olan enzimlerin eksik olduğu albino hastalarda deri oldukça açıktır [108].

Kemik iliğinden kaynaklanan ve melonositler gibi dendritik görünüme sahip Langerhans hücreleri, deride antijen sunan hücreler (APC) olarak immün sistemin bir parçası olarak görev alırlar.

Dış kaynaklı antijenleri hem derideki hem de lenf nodüllerindeki T lenfositlere sunarlar [93]. Langerhans hücreleri, esas olarak alerjik kontakt ekzemada rol oynarlar. Aynı zamanda viral ve tümoral antijenlere karşı da immün savunmada yer alırlar. Sinir uçları ile birlikte dermiste bulunan Merkel hücreleri ise derinin duyuşsal sinir bileşenini oluşturmaktadır [98]. Dokunma duyuşundan sorumlu taktıl reseptörler olduğu düşünülmektedir. Bu hücreler parmak uçları, oral mukoza, dudaklar ve kıl folikülleri gibi derinin belli başlı bölgelerinde bulunur. Lenfositler derinin spesifik immün yanıtlarını oluşturan hücreşel immün sisteminin bir parçasıdır [93].

b) Spinoz Katman (Stratum Spinosum, Dikenli Katman)

Keratin üretimine başlamış olan spinoz katman, bazal tabakanın üzerinde yer alan kübik ya da hafifçe yassı hücrelerden oluşmaktadır [107]. Karakteristik mikroskopik görüntüsü, hücre yüzeyinde çok sayıda dikensi çıkıntı (desmozom) görülmesi şekkindendir. Bunlar komşu hücrelerle bağlantıyı sağlayan, keratin filamentler içeren, hücreler arası bağlantı yapılarıdır. Keratin sentezinin bir aşaması olan tonofilament sentezi bu tabakada yapılmaktadır. Hücreler arasında lenf sıvısına benzer intersellüler bir sıvı bulunur. Epidermin beslenmesinin bu sıvı yoluyla olduğu zannedilmektedir. İmmünolojik fonksiyona ve antijen oluşturma yeteneğine sahip Langerhans hücreleri de en çok bu tabakada yer alır [101].

Bazal katmanın tipik hücre organellerine ek olarak spinoz katmanda Odland cisimciğı adı verilen lipit yüklü lamellar cisimcikler, keratinozomlar ve ilk olarak bu katmanda görölmeye başlayan membrana örtücü granüller gözlenir. Spinoz katmanda, bazal hücrelere oranla belirgin hücreşel keratin filamenti artışı vardır. Spinoz katman için biyokimyasal belirteçler keratin 1 ve keratin 10'dur. Keratin, sağlam ve esnek bir koruyucu örtünün ortaya çıkmasına yardımcı olmaktadır [104].

c) Granüler Katman (Stratum Granulosum)

Granüler tabaka olarak isimlendirilmelerinin nedeni sitoplazmalarında keratohyalin granülleri içermeleri ve artık yassılaştırmış olan çok sıralı geniş poligonal hücrelerden oluşan granüler katmandır. Keratohyalin granülleri, proflagrin, filagrin, lorikrin, keratin 1 ve keratin 10 benzeri sisteinden zengin proteinleridir. Özellikle flagrin ve lorikrin tuğla ve harç benzeri yapı sergileyen epidermisteki keratinositlerin yapımında anahtar rol oynar [92].

Bu tabakadaki üç ya da beş hücre kalınlığındaki düzleşmiş hücreler, keratinizasyonun ilk bulgularını gösterir. Bu katmandan sonra artık keratinositlerin hem işlevi hem de morfolojisi değişmekte ve poligonal şekilden daha şekilsiz yassı duruma geçerek bol miktarda hücre içi keratin depolamaktadır. Her ne kadar, çekirdek dağılması bu tabakada başlasa da hücrelerde çekirdek hala vardır. Bu tabaka canlı epidermisin en dış sınırındır. Hidrofilik maddeler için önemli bir bariyer değildir. Ancak stratum corneum zedelenirse, canlı epidermis, difüzyonu sınırlandıran bir bariyer haline gelebilir [93].

d) Lusidum Katmanı (Stratum Lucidum)

Sadece el içi ve ayak tabanı gibi derinin çok kalın olduğu bölgelerde bulunan, bir ya da iki sıra keratinosit katmanından oluşan bir tabakadır. Çekirdek ve diğer sitoplazmik organelleri olmayan yassı hücreler, eleidin adı verilen özel homojen bir yapı içermektedir. Normal tabakalardan daha açık renkte görünür [101].

e) Korneum Katmanı (Stratum Corneum, Boynuzsu Tabaka)

Derinin bariyer işlevinde başlıca yapı olan epidermisin en dış tabakası korneum katmanı yaklaşık olarak 6-15 µm kalınlığındadır [109].

Korneum katmanı, kozmetik ürünlerle, kumaşlarla ve diğer yüzeylerle temas halindedir. Farklılaşmanın son dönemlerinde keratinlerin flagrin ile etkileşimi sonucu sitoplazma ve interselüler organellerden yoksun olan 15 katmanlı yassı, keratinden zengin, korneosit tabakasından meydana gelmektedir [97, 110]. Korneum katmanı, ölü hücre tabakası olarak açıklanabilir. Çünkü hücreler protein sentezi yapamazlar ve hücre sel sinyal vermeden sorumlu değildirler.

Bu hücreler keratinositler, korneosit haline dönüşmüştür. Bu tabakada bulunan keratinositler, keratinizasyon sürecini tamamlamış en olgun hücrelerdir [101].

Korneositlerin düzenlenmeleri tıpkı tuğla ve harçtan bir duvara benzemektedir. Tuğlalar korneositlerden oluşmaktadır. Harç kısmı ise, protein ve yağ içeren, lamellar granüllerden elde edilen bileşenlerden yapılmıştır [111-113].

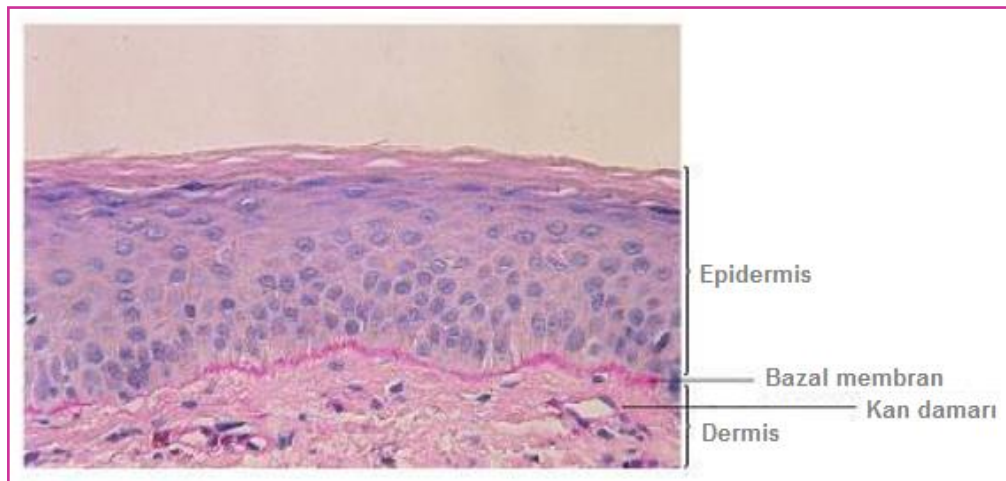
Epidermal lipitler metabolizmanın ara ürünlerini veya dışarıdan alınan uçucu yağ asitlerini kullanarak keratinositler tarafından sentezlenmektedir. Sentezlenen lipitlerin birçoğu lamellar cisimciklerde depolanmaktadır. Sinyal durumunda kalsiyum derişimindeki olası bir artış ile lamellar cisimcikler içeriklerini ekzositoz yoluyla hücreler arası boşluğa bırakır [114].

Korneum katmanının ekstraselüler lipit membranı, başlıca %40 seramidler ve türevlerini, %25 kolesterolü, %10-%15 serbest yağ asitlerini içermektedir [99, 115]. Seramid, korneum katmanındaki lipit ağırlığının %30-50'sini oluşturan başlıca lipittir [116, 117]. İnsan korneum katmanında tanımlanmış en az sekiz seramid alt tipi bulunmaktadır [94]. Seramidlerdeki açıl zincirlerinin uzunluğu 16-33 karbon iken serbest yağ asitlerinde 12-36 karbon atomu arasında değişmektedir [118]. Epidermiste akışkanlık ve esneklik sağlayan kolestrolün ise büyük çoğunluğu in situ olarak asetattan sentezlenmektedir [119]. Bileşiminde daha az miktarlarda trigliseritler, stearyl esterleri ve kolesterol sülfat bulunmaktadır. Bu lipitler, epidermis aracılığıyla sentezlenirler ve lamellar granüllerde paketlenirler. Ardından, farklılaşırlar ve su bariyerini oluştururlar. Bu lipitler, boynuzsu tabakanın önemli parçalarıdır ve TEWL'i önleme ve zararlı bakterilerin girişini engellemede rol oynarlar. Korneum tabakasındaki lipit miktarı ve cinsi bulunduğu vücut bölgesine göre değişmektedir. Genel olarak permeabilitenin, korneum tabakasındaki lipitlere göre belirlendiği kabul edilmektedir [102]. TEWL'in ölçülmesi bazı kimyasal maddelerin kullanımı, fiziksel yaralanmalar veya ekzama gibi patolojik durumlarda deri hasarını ortaya koymak için yararlı olabilmektedir. Bunun nedeni, hasarın derinliği arttıkça TEWL'in de artmasıdır [98]. Epidermal bariyer işlevinde bozukluk meydana gelmesi daha çok atopik ekzama ve psoriasis gibi deri rahatsızlıklarının tanımlanmasında önemli bir faktördür [120].

Korneum katmanının temel proteinlerinden bir diğeri de histidinden zengin filagindir. Bu protein, plastiklik, nem tutma ve UV koruma özelliklerine sahip doğal nemlendirici faktör (NMF) olarak bilinen, aminoasitlere ve diğeri bileşenlere hidrolize olabilmektedir. Hücre içi lokalize olmuş NMF ve lipitler, lamellar granüller tarafından açığa çıkartılır. Hücre dışına lokalize olanlar ise, cilt hidrasyonunda, esnekliğinde ve elastikiyetinde önemli bir rol oynamaktadırlar [98].

2.2.2.2 Dermis

Dermis, 3-5 mm kalınlığında olan, epidermis ve subkutan yağ dokusu arasında yer alan bir tabakadır. Cildin kozmetik görünümünde anahtar rol oynayan bu tabaka, derinin kalınlığından sorumludur. Sinirlerle, kan damarlarıyla ve ter bezleriyle kaplı dermis, en fazla kollajen içermektedir. Bu tabakanın en üst kısmı, epidermisin aşağısında bulunmakta olan papiller dermistir. Papiller dermisin altındaki tabaka da retiküler dermis olarak adlandırılmıştır. Papiller dermis retiküler dermisle kıyaslandığında, daha ufak kolajen demetleri içermekte olup, daha fazla hücresel ve damarsal elementler içerdiğinden daha yüksek bir yoğunluk göstermektedir. Dermisteki başlıca hücre tipi olan fibroblastlar, kolajen, elastin, diğeri matriks proteinleri ile kolajenaz ve stromelisin gibi enzimleri üretirler. Mast hücreleri, polimorfonüklear lökositler, lenfositler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücreleri de dermiste yer almaktadır. Dermis ve epidermis arasındaki bağlantıya dermal-epidermal bağlantı denmektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2. 7 DEJ'nin histopatolojik görünümü [121]

2.2.2.3 Hipodermis

Vücut için önemli bir enerji kaynağı olan ve en çok yağdan oluşan hipodermis veya subkutan doku, dermisin hemen altında bulunmaktadır. Bu tabaka ayrıca, tip I, III ve V kolajeni içermektedir. Bu tabaka, deriye fiziksel destek verir. Ayrıca, kolajenler yoluyla deriye esneklik sağlar ve ısı yalıtımını temin eder. Ayrıca ana kan damarları da bu tabakada yer almaktadır. Yaşlandıkça, subkutan yağ dokusunun bir kısmı kaybolur veya istenmeyen bölgelere yeniden dağılır. Bu olay, yaşlı görünmeye neden olmaktadır [121].

2.3 Cilt Pigmentasyonu

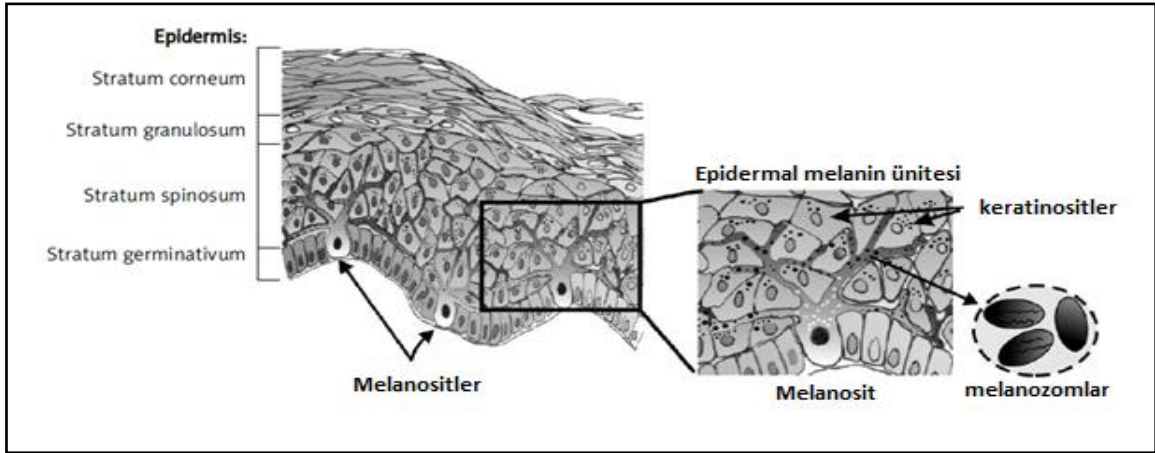
İnsan derisi, beyazdan kahverengiye, kahverengiden siyaha kadar geniş bir aralıkta farklı renk ve geçişe sahiptir. Bu durum, cildin derin katmanlarında üretilen fakat vücut yüzeyinde bir mozaik gibi görülen melanin ismindeki kimyasal olarak inert ve stabil bir pigmentin varlığına dayalıdır. Bu nedenle melanin, insanlardaki en çarpıcı polimorfik özellik ve en belirgin coğrafi çeşitlilik olan cilt renginden sorumludur.

Melanin etnik kökenin belirlenmesinde rol oynamanın yanı sıra vücudu zararlı UV ışınlarına ve diğer çevresel etkenlere karşı savunmada önemli bir rol oynarlar [96]. Fitzpatrick sistemi, farklı cilt pigmentasyon fenotiplerini ayırt etmede kullanılan en yaygın sistemdir. Bu sistem, eritemi ve UV ışınlarına maruziyet sonrası meydana gelen pigmentasyonu derecelendirerek 6 fototip (I-VI) tanımlar [1, 122].

Pigmentasyon, genetik olarak belirlenen melanin seviyesini yansıtır ve çeşitli düzenleyici faktörler ile değiştirilebilir [96, 123]. İntrinsik faktörler (keratinositler ve fibroblastlar tarafından salınan, endokrin, inflamatuvar ve nöronal hücreler) veya zararlı eksternal faktörlere (UV radyasyon ve ilaçlar) maruziyet, hem geçici (hamilelik) hem de kalıcı (ör; yaşlılık lekeleri) tarzdaki pigmentasyonu etkileyebilir[96, 124].

2.3.1 Epidermal Melanin Ünitesi

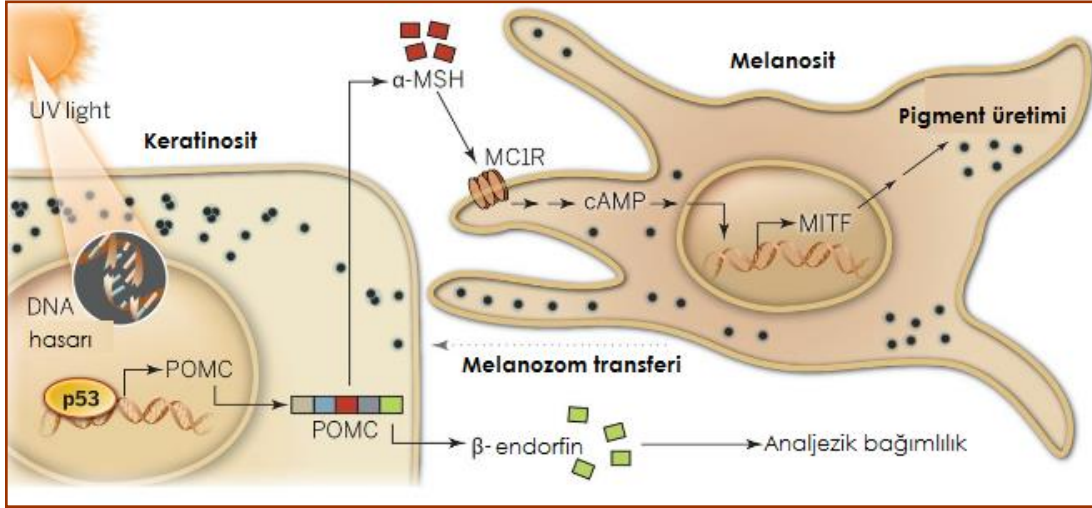
Keratinositler ve melanositler arasındaki anatomik ilişki “epidermal melanin ünitesi” olarak bilinmektedir. Epidermal melanin ünitesinde, her bir melanositin, bazal ve suprabazal tabakalardaki 40 adet keratinositle temas halinde olduğu tahmin edilmektedir [125] (Şekil 2. 8).



Şekil 2. 8 Epidermin yapısı [126]

Melanosit, bazal tabaka hücreleri arasında yer almakta ve dendritik prosesler aracılığıyla epidermal melanin ünitesindeki yaklaşık 30-40 adet keratinositle temasa geçmektedir. Melanosit, melanozomlarda melaninleri sentezlemekte ve onları UV radyasyondan korumak amacıyla keratinositlere iletmektedir.

Epidermal melanin ünitesi, melanositler ve keratinositler olmak üzere iki hücre tipinden oluşan, epidermisteki fonksiyonel ve yapısal bir komplekstir. Çeşitli ırklar arasında cilt rengindeki varyasyon, başlıca üretilen ve etrafında yer alan bir keratinosit kümesine transfer edilen melanozomların sayısı, melanin içeriği ve dağılımı ile belirlenir [127]. Melanozomlar dendritler aracılığıyla etrafındaki keratinositlere iletilirler ve güneşten korunmada kritik bir rol oynarlar. Melanin granülleri, keratinositlerde çekirdeğin üzerinde birikirler ve zararlı UV ışınlarını çekirdeğe ulaşmadan ve DNA'ya zarar vermeden önce absorbe ederler. Melanin, ciltte düzgün bir biçimde üretildiğinde ve dağıtıldığında, bölünen hücreler en azından kısmen mutasyondan korunabilir [128] (Şekil 2. 9).



Şekil 2. 9 UV radyasyona maruziyetinde melanin pigmentinin rolü [129]

Melanosit-keratinosit kompleksi, çok çeşitli çevresel uyaranlara sıklıkla parakrin ve/veya otokrin yolla hızlı bir biçimde yanıt verir. Böylelikle, melanositler UV radyasyon, aguti sinyal proteini, melanosit stimüle edici hormon (MSH), endotelinler, büyüme faktörleri, sitokinler gibi etkenlere karşılık verirler.

UV radyasyona maruziyetten sonra, melanositler, proopiomelanokortin (POMC, MSH'in prekürsörü) ve reseptörü melanokortin 1 reseptörünün, tirozinaz (TYR) ve tirozinaz ile ilgili protein-1 (TYRP1), protein kinaz C (PKC) ve diğer sinyal faktörlerinin ekspresyonunu arttırırlar [130, 131].

Diğer yandan, UV'nin keratinositler tarafından endotelin-1 (ET-1) ve POMC üretimini stimüle ettiği bilinmektedir. Daha sonra bu faktörler, melanosit fonksiyonunu stimüle etmek için parakrin bir davranış sergilerler [132, 133].

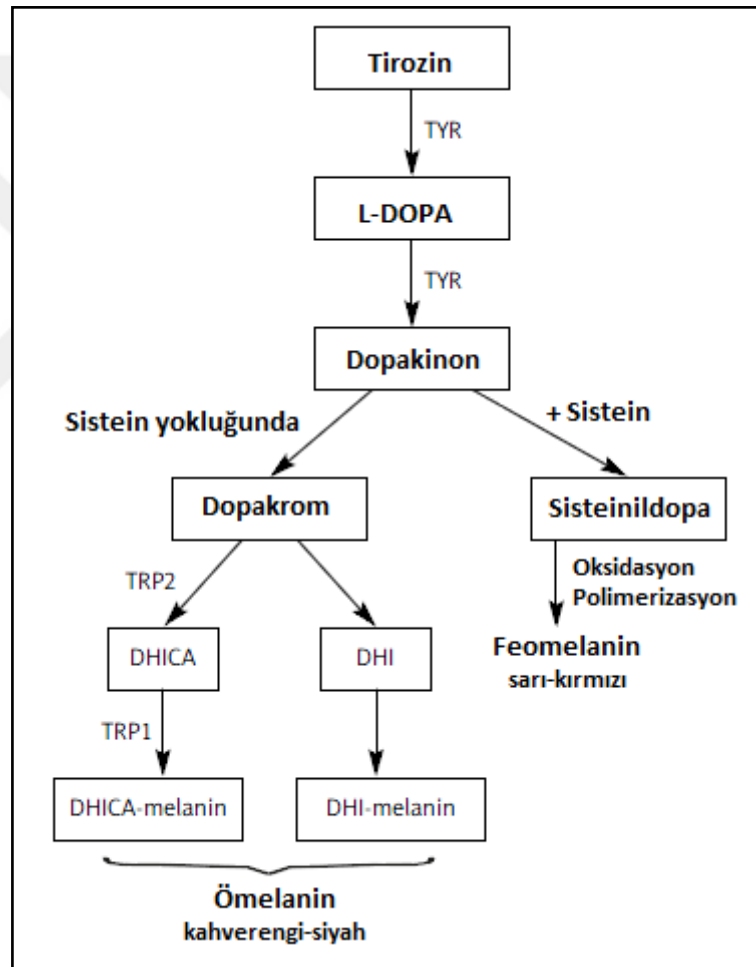
Keratinositlere ek olarak, fibroblastlar ve ciltteki muhtemel diğer hücreler, sitokinleri, büyüme faktörlerini ve inflamatuvar mediyatörleri üreterek, melanin sentezini ve/veya melanositler aracılığıyla keratinositlere melanin transferini arttırırlar [134].

2.3.2 Melanogenez

Melanogenez, melanin sentezinden sorumlu biyokimyasal bir yolaktır [135]. Melanin biyosentezi, melanozomlar olarak adlandırılan membrana bağlı organeller içerisindeki çok özel hücreler olan melanositler içerisinde meydana gelen kompleks bir olaydır [136].

Melaninin, feomelanin ve ömelanin olmak üzere başlıca iki tipi vardır. Bu iki tip, sentez yolu ve renk açısından birbirinden farklılık gösterir. Melanin, UV ışınlarını absorblama ve dağıtmada, serbest radikalleri ortadan kaldırmada, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında ve iyon depolanmasında vücut için yararlı olan sayısız göreve sahiptir. Yoğun güneş ışığına maruziyet sonucunda sentezi artar. En fazla deride bulunmakla birlikte, saçta, gözün iris tabakasında, iç kulağın stria vascularis ve beyin kökünün substantia nigra bölgelerinde de bulunur [96, 137, 138].

Üretilen melanin tipinin belirlenmesinde melanogenez enzimlerinin fonksiyonları ve substratların kullanımı aşağıdaki Şekil 2. 10' da görülmektedir.



Şekil 2. 10 Melanogenez sırasında melanositlerdeki melanin sentezinin sadeleştirilmiş şeması [126]

Tirozinaz, başlıca enzimler tirozinaz (TYR), tirozin ilişkili protein 1 (TYRP1) ve 2 (TYRP2) enzimlerinin etkisi altında melanine (ömelanin ve feomelanin olarak adlandırılan pigment karışımı) dönüşür.

TYR, L-3,4-dihidroksifenilalanin hızla dopakinona okside olması amacıyla tirozin hidroksilasyonunu gerçekleştirir [139]. Sistein varlığında dopakinon sisteinle etkileşerek 3- veya 5-sisteinildopanin oluşmasını sağlar. Daha sonra oksidasyon ve polimerizasyon gerçekleşir ve sarı-kırmızı renkteki çözünür melanin olan feomelanin sentezlenir [135, 140].

Tiyollerin (sistein, glutatyon veya tiyoredoksin) yokluğunda kahverengi-siyah renkteki ömelanin üretilir. Dopakinon kendiliğinden siklizasyona uğrar [141]. Dopakrom kendiliğinden karboksilik asit kaybeder ve 5,6-dihidroksiindol (DHI) meydana gelir. DHI, hızla oksidize ve polimerize olarak koyu kahverengi-siyah renkteki çözünür olmayan DHI-melanine dönüşür.

Ancak, eğer dopakrom tatomeraz (TYRP2/DCT) bulunuyorsa, dopakrom, DHI-2-karboksilik asiti (DHICA) oluşturur [142]. Tirozinaz ve TYRP1 sonuç olarak daha açık kahverengindeki DHICA-melanini elde etmek için daha fazla dönüşümü katalize eder [135, 143].

İnsan cildi tüm melanin tiplerinin bir karışımını içermektedir. Kısmen bunların oranları görünür pigmentasyonu belirler [144].

Ömelanin içeriğine bağlı olan farklı etnik gruplar arasındaki cilt pigmentasyonunun çeşitliliği korunmaktadır. Ömelaninin toplam melanine oranı cilt rengini belirler [143]. Feomelanin cilt rengiyle korelasyon göstermez. Koyu ve açık tenli kişilerde bu pigmentin yoğunluğu benzerdir. Saç rengini ise ömelaninin feomelanine oranı belirler [145]. Ömelanin, feomelanine kıyasla degradasyona daha yüksek dayanıklılık gösterme ve reaktif oksijen türlerini (ROS) nötralize etme gibi daha iyi fotokoruyucu özelliklere sahiptir [146]. Ömelaninlerin fotokorumada kırmızımsı feomelaninden daha etkili olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak, açık tenli ciltlerde cilt kanseri riski koyu tenlilerden 30-40 kat daha yüksektir [140]. Melanogenez düzenleyici genlerin ürünleri, subsellüler, sellüler, doku ve çevresel düzeylerde hareket eder [147]. Melanogenez sırasında, ara ürün olarak sitotoksik moleküller (hidrojen peroksit, kinonlar) sentezlenir. Böylelikle, melanositler melanozomlardaki melanogenez alanlarını ayırarak kendilerini korurlar ve antiapoptotik protein Bcl-2'nin seviyesini arttırırlar [147, 148].

Halen bir tartışma konusu olarak kalsa da melanozomların muhtemelen melanositlerin endoplazmik retikulumlarından meydana geldiği düşünülmektedir [2]. Melanozomların gelişmeleri için TYR, TYRP1 ve TYRP2 gereklidir. Bu üç enzimden TYR, melanogenez için hayati öneme sahiptir. TYR, endoplazmik retikulumun ribozomlarında sentezlenir ve normal yapı ve fonksiyonları için gerekli bir proses olan glikolizasyonun gerçekleştirdiği Golgi kompleksine taşınır [149, 150].

Melanozomların gelişmesinde dört basamak bulunmaktadır (Şekil 2. 11). İlk olarak glikoproteinler (Pmel17, MART-1) tarafından oluşturulan fibriller matriksin içerisinde bir vezikül gelişir (1. evre). 2. evrede TYR ve melanogenezin diğer enzimleri oluşur. Melanozomlar polimerize olan ve internal fibriller üzerinde yerleşen melanini üretir (3. evre). Son aşamada melanozomlar melanin ile doldurulur (4. evre).

Melanozom özellikleri	1. evre	2. evre	3. evre	4. evre
				
Şekil	Küresel	İnce-uzun	Elipsoidal	Elipsoidal
İnternal Yapı	–	Matriks fibrilleri görünür	Matriks fibrilleri görünür	Matriks fibrilleri polimerize melaninle kaplıdır
TYR	–	+	+	+
TYRP1	–	+	+	+
TYRP2	–	+	+	+
Melanin sentezi	–	–	Başlar, internal fibriller üzerine yerleşir	Melaninle dolu
Renk			Kahverengi	Koyu kahverengi-siyah

Şekil 2. 11 Melanin sentezi sırasında melanozomların gelişim aşamalarının özellikleri

1. evredeki premelanozomlar amorf bir matrikse sahip olan yuvarlak ve küçük veziküllerdir. 2. evrede melanozomlar düzenli yapısal fibriller bir matrikse sahiptir. Bu evrede TYR bulunur fakat pigment sentezi görülmez. Melanin sentezinin üretimi 3. evrede gerçekleşmeye başlar. Pigment bu evrede protein liflerde depolanmaktadır. Son evre olan 4. evrede ise pigment tüm melanozları doldurur [126, 151]. Melaninle dolu olan melanozomlar, tirozinaz aktivitesini kaybeder ve çevredeki keratinositlere iletilir [152].

2.3.3 Melanin Pigmentasyonunu Etkileyen Faktörler

2.3.3.1 Enzim Üzerindeki Etkisi

Melanin oluşumu, renksiz bir aminoasit olan tirozinin çözünür olmayan kahverengi bir polimere dönüşümünü içermektedir. Bu proses, memeli dokularında yalnızca TYR enziminin katalitik aktivitesi ile yürütülür. Moleküler oksijen ve TYR varlığında, tirozin dopaya oksidize olur. İlk reaksiyonda oluşan dopa, geri dönüşümlü bir reaksiyonla enzimatik olarak dopakinona oksidize olur. Böylelikle oluşan dopakinon, reaksiyon sisteminde askorbik asit gibi indirgen ajan varlığında dopaya yeniden indirgenebilir. Diğer aşamalar enzimlerin yokluğunda ilerleyebilir [153]. TYR bir bakır protein kompleksidir.

Melanin oluşumu, TYR aktivitesi inhibe edildiğinde engellenebilir. Sıcaklık, pH, substrat konsantrasyonları ve enzimatik bir reaksiyonu etkileyen inhibitörlerin varlığı ya da yokluğu gibi genel faktörler, TYR reaksiyonunu doğal olarak etkilemektedir. TYR aktivitesini spesifik olarak etkileyen diğer faktörler aşağıdaki gibi gruplanabilir:

1. Bakır bağlayıcı ajanlar: Bakır, enzimatik aktivite için TYR'nin esansiyel bir kısmıdır.

Bakırı bağlayan herhangi bir ajan enzimi inaktif hale getirir. Bu ajanların arasından reaktif bir sülfhidril grubuna sahip olan bileşenler enzim reaksiyonunu inhibe edecektir. Rothman ve ark.ları 1940'ların başlarında yürüttükleri bir çalışma sonucunda, diyaliz edilebilir, suda çözünür sülfhidril taşıyan bileşenlerin insan epidermisinde tirozin ve dopadan melanin oluşumunu inhibe ettiklerini bildirmiştir [154]. Halprin ve Ohkawara, epidermal ekstraktlarda bulunan sülfhidril bileşeni indirgenmiş glutatyonun melanin oluşumunu ortadan kaldırdığını göstermiştir. Çalışmada ayrıca Zenci ve Kafkas ırkı ciltleri kıyaslanmış ve Zenci cildinin Kafkas cildine göre daha az indirgenmiş glutatyon ve glutatyon redüktaz içerdiği saptanmıştır.

Adachi, melanotik ve amelanotik fare melanomalarında enzim aktivitelerini karşılaştırmıştır. Sonuçta, amelanotik tümörlerin gözle görülür bir TYR aktivitesinin olmadığını fakat melanotik tümörlere kıyasla yaklaşık iki kat daha fazla glutatyon peroksidaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur [155]. Hu, ergotionin ve Cleland reaktifi gibi reaktif sülfhidril gruplarına sahip ajanları kültür ortamına ilave etmiş ancak melanogenezi inhibe etmede etkisi olup olmadığını ortaya çıkaramamıştır.

Bu bileşenler, yüksek konsantrasyonlarda hücre büyümesini tamamen ortadan kaldırırken, düşük konsantrasyonlarda herhangi bir etki göstermemektedir [156].

2. İndirgen ajanlar: Tirozinin dopakinona dönüşümüne katılan ilk reaksiyon oksidatif bir proses olduğundan, güçlü indirgen ajanlar bu reaksiyonu etkileyebilir. Örneğin, askorbik asit, in vitro bir depigmentasyon ajanı olarak düşünülmektedir.

3. TYR inhibitörleri: Satoh ve Mishima [156] ve Chian ve Wilgram , Fortner's hamster melanomada ve S91, B16 ve Harding-Passey fare melanomalarında TYR inhibitörlerinin varlığını göstermiştir. Bu inhibitörlerin hem pigmente hem de non-pigmente tümörlerde yüksek aktivite gösterdikleri bulunmuştur. UV ışınlarının Chian ve Wilgram tarafından izole edilen inhibitörü inaktive ettiği gösterilmiştir. Fortner's melanomada inhibitör, bakır ilavesi ile değişmez. Bu nedenle, bir sülfhidril bileşeni olarak görünmemektedir [157].

2.3.3.2 Melanositlerin Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Hormonların, kimyasalların ve radyasyonların melanositler üzerindeki etkileri gösterilmiştir. Snell, α -MSH'nin kobay derisindeki serbest melanin miktarını arttırmasına ilaveten melanositlerin boyutu ve dendritik proseslerinin karmaşıklığında bir yükselme meydana getirdiğini bildirmiştir [158]. Benzer şekilde Lerner ve McGuire, α -MSH ve β -MSH'nin insan derisinde koyulaşma meydana getirdiğini gözlemlemiştir [159]. Literatürde, östrojen ve progesteron gibi diğer hormonların, hayvanlarda hem melanositleri hem de melanin pigmentasyonunu etkilediği rapor edilmiştir. UV radyasyonun, melanosit popülasyonunda bir artışın eşlik ettiği ya da etmediği melanin pigmentasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir [160-162]. Ayrıca literatürde, X ışınları ve toryum X'in lokal olarak deriye uygulanmasının melanositlerin aktivitesinde artışa yol açtığından bahsedilmektedir [163, 164].

2.3.4 Pigmentasyon Bozuklukları

Melanogenez farklı evrelere sahip kompleks bir süreçtir. Bu süreç bozulduğunda, melanositlerin sayısında bir değişime neden olan ya da olmayan, hipo veya hiperpigmentasyon olarak sınıflandırılan farklı pigmentasyon hasarları görülmektedir [1-3]. Pigmentasyon hasarları ile bağlantılı, konjenital veya edinilmiş, kalıcı veya geçici, sistemik veya deri ile lokalize çok çeşitli dermatozlar bulunmaktadır [3]. Bu dermatozların hastanın yaşam kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olması ve tedavilerindeki tatmin edici olmayan sonuçlar nedeniyle, ilaç ve kozmetik endüstrileri devamlı olarak yeni çözümler araştırmaktadır [8, 9].

Melanositler, nöral krest melanoblast hücreleri kökenli olup, nöral tüpün kapanmasının ardından epidermin bazal katmanı ve saç folikülleri olmak üzere farklı bölgelere göç etmektedir [96, 165, 166]. Bunların melanin üreten hücrelere migrasyonu, proliferasyonu ve diferansiyasyonu, melanositler ve melanoblastlardaki c-Kit reseptör tirozin kinaza bağlanan WNT glikoproteinlerinin ailesi, endotelin 3 (EDN3) ve kök hücre faktörü (SCF) gibi dorsal nöral tüp, ektoderm ve keratinositler tarafından üretilen mediyatörlere bağlıdır [96, 167]. Kemik morfogenetik proteinleri bu olayları antagonize eder. Böylelikle, bu mediyatörlerin salınımı melanosit migrasyonu aşamasında azalır. Piebaldizm, c-Kit ve SCF genlerindeki mutasyonun sebep olduğu, depigmente maküllerin eşlik ettiği bir genodermatozdur [96, 166, 168] (Çizelge 2. 1).

Piebaldizmde lökodermal alanlar içerisinde hiperpigmente alanların bulunması vitiligodan ayırt edilmesini sağlar. Bu lezyonlar sıklıkla baş, gövde, kol ve bacaklarda orta hatta yerleşir. El ve ayak sırtlarında görülmez. Piebaldizm doğumdan itibaren mevcut ve kalıcı iken vitiligo genellikle doğumda ortaya çıkmaz ve oluştuktan sonra genişleyerek yayılım gösterir. Piebaldizmde deri lezyonlarına nadir olarak heterokromi ve sağırlık da eşlik edebilir. Dolayısıyla piebaldizm tanısı, klinisyen için; Waardenburg sendromu ve Woolf sendromu açısından uyarıcı olmalıdır. Hastalar mutlaka görme ve duyma muayeneleri ile değerlendirilmelidirler [169].

Melanin sentezi, lizozomla ilişkili organeller olan melanozomlarda meydana gelir. Melanozomların hasarı, kutanöz hipopigmentasyon ve sistemik belirtilerin eşlik ettiği Chediak-Higashi sendromu ve Hermansky-Pudlak sendromundan sorumludur [124, 151, 168, 169] (Çizelge 2. 1). Cilt pigmentasyonunda görev alan, melanojenik enzimlere ve melanine (glikoprotein Pmel17) bağlanan fibriller matriks bileşenleri gibi anahtar proteinler melanozomlarda yer alır. Bu organellerde, yapısal matriks düzenlenir, TYR enzimi elde edilir ve dört olgunlaşma evresi ile melanin sentezi gerçekleşir [2, 96, 124, 151]. Melanojenik enzimlerin elde edilmesi, membranla ilişkili dönüştürücü protein (MATP) ile düzenlenir ve ilgili genin mutasyonu okülokütanöz albinizm tip 4'ü belirler [96, 124, 168]. Melanin sentezi tamamlandığında melanozomlar, mikrotübül proteinler (kinesin, dinein) tarafından kontrol edilen bir hareket içinde çift yönlü olarak perinükleer alandan melanosit dendritlerine doğru hareket eder. Bu hareket, melanzomların, miyozin Va, Rab27a ve melanofilin (mlph) tarafından oluşturulan bir kompleks aracılığıyla aktin filamentlere bağlanmasıyla son bulur [2]. İlgili genlerdeki mutasyonlar, Griscelli sendromunun çeşitli formlarını belirler [124] (Çizelge 2. 1). Melanozomların tamamen olgunlaşması için melanozomal membrandaki protein pompası p-proteine bağlı intramelanozomal pH'ta 5'ten 6,8'e bir artış gereklidir [170]. Bu evre, bir taraftan, fonksiyonel p-proteinin kaybının neden olduğu okülokütanöz albinizm tip 2, diğer bir taraftan proton pompası inhibitörleri ile tedavi edilen vitiligo hastalarında gözlenen repigmentasyon tedavisi seçeneklerine daha düşük yanıt nedeniyle önemlidir [124, 166, 170] (Çizelge 2. 1).

Çizelge 2. 1 Hipopigmentasyon ve depigmentasyon ile genodermatozlar [124]

Genodermatozlar	Melanogenez üzerindeki hasarı	Etkilenen gen	Kalıtım; klinik özellikleri
Piebaldizm	Melanoblast proliferasyonu, cilt makülleri	C-KT, SCF	Otozomal Dominant, pigmentsiz ve beyaz perçem
Waardenburg Sendromu (WS)	Melanoblast proliferasyonu ve migrasyonu	WS1 ve WS3, PAX3 WS2, MITF, SOX10 WS4: SOX10, EDN3	Otozomal Dominant, pigmentsiz cilt makülleri, beyaz perçem, iris heterokromisi, sağırılık
Tietz Sendromu	Melanoblast proliferasyonu ve migrasyonu	MITF	Otozomal Dominant, hipopigmentasyon, sağırılık
Okülokutanöz albinizm	Melanin sentezi	OCA1: TR OCA2: OCA 2 (p geni) OCA3: TRP1 OCA4: MATP	Otozomal Resesif, pembe cilt, beyaz saç, sarı, kahverengi, kırmızı göz bebeği, görme keskinliğinde azalma, nistagmus, fotofobi
Menkes Sendromu	Melanin sentezi	ATP7A	X'e bağlı resesif, seyrek saçlar, nörolojik bozukluklar

Çizelge 2. 1 Hipopigmentasyon ve depigmentasyon ile genodermatozlar (devamı)

Genodermatozlar	Melanogenez üzerindeki hasarı	Etkilenen gen	Kalıtım; klinik özellikleri
Chediak-Higashi Sendromu	Melanozom sentezi	LYST	Otozomal Resesif, cilt ve saçta gümüş parlaklığı, iriste hipopigmentasyon, nörolojik bozukluklar, oküler albinizm immün yetmezliği, pansitopeni
Hermansky-Pudlak Sendromu	Melanozom sentezi	HPS	Otozomal Resesif, deride beyaz lekeler, oküler albinizm, kanama eğilimi
Griscelli Sendromu	Melanozom transferi	GS1: MYO5A GS2: RAB27A GS3: HPLM	Otozomal Resesif, cilt ve saçta hipopigmentasyon, oküler albinizm, nörolojik bozukluklar

Epidermiste, her bir melanosit hücresi dendritleri aracılığıyla, olgun melanozomların keratinositlerin sitoplazmasına transferine olanak sağlayarak, 30-40 keratinosit ile etkileşir [1, 165]. Bu transfer tam olarak anlaşılamamış olsa da ekzositoz, sitofagositoz, plazma zarlarının füzyonu ve membrana veziküllerinin transferi gibi farklı mekanizmalarla açıklanmaktadır [2].

2.3.4.1 Hipopigmentasyon

Cilt pigmentasyonu başlıca kan ve melaninden kaynaklanmaktadır. Hipopigmentasyon, azalmış pigmentasyonun herhangi bir formu anlamına gelir. Hipomelanozis spesifik olarak melanin içeriğindeki bir azalmayı, depigmentasyon ise neredeyse her zaman melanin eksikliği nedeniyle ortaya çıkan pigment yokluğunu belirtir. Hipopigmentasyon hastalıkları genellikle etiyolojisine (konjenital veya edinilmiş), başlangıç yaşına (çocukluk ya da yetişkinlik) ve lezyonların derecesine (lokalize veya jeneralize) bağlı olarak sınıflandırılır. Bunların yanı sıra, hastalık pigment kaybının derecesi, ilişkili morfolojik belirtiler ve yer aldığı bölge gibi klinik bulgulara dayanarak da ayırt edilebilir [171].

a) Vitiligo

Vitiligo klinik olarak depigmente makül ve yamalar ile karakterizedir. Histolojik olarak epidermisteki ve daha az sıklıkta saç foliküllerindeki melanositlerin yokluğu veya azalmasıyla ilgilidir. Vitiligo sık rastlanan ve genel popülasyonun % 0,5 ile 2'sini etkileyen bir hastalıktır. Ortalama 20 yaşında başlamakla birlikte en sık 10 ile 30 yaşları arasında görülmektedir [172]. Hastalar, vitiligonun başlangıç yaşı olarak % 25-30 arasında çocukluk döneminde başladığını rapor etmiştir [173, 174].

Hastalık için kesin bir cinsiyet ayrımı yoktur. Vitiligo hem genetik hem de çevresel faktörlere bağlı gelişen multifaktöriyel bir hastalıktır [175].

Vitiligolu ciltte fonksiyonel melanositlerin yokluğu, muhtemelen melanositlerin hasarının bir sonucudur. Melanositlerin hasarı için çeşitli patojenik hipotezler öne sürülmektedir:

1. Otoimmün hipotezi
2. İntrinsik melanosit bozukluğu hipotezi
3. Hasarlı serbest radikal savunma hipotezi
4. Azalmış melanosit hayatta kalma hipotezi
5. Transepidermal melanositorajik hipotezi

Çalışmalardan elde edilen bulgular daha çok otoimmün bir patogenezi destekler nitelikte olsa da, nörohüморal, sitotoksik veya oksidatif stres gibi birden çok patofizyolojik sürecin de etiyolojisinde rol oynadığına dair bulgular mevcuttur [175].

Vitiligo süt beyazı maküller ve keskin sınırlı yamalar ile karakterizedir. Lezyonlar genellikle yüz (Şekil 2. 12), boyun, koltuk altı, dirsek, diz, baldır ve el ve ayakların dorsal kısımlarında simetrik olarak dağılım gösterir [173]. Bu görünür bozukluk bireylerde psikolojik, sosyal ve fizyolojik açıdan birçok probleme yol açabilir. Örneğin, kafa derisi üzerinde beyaz lekeler veya çizgiler bırakarak saç rengini (her zaman olmasa da) etkileyebilir. Benzer şekilde kirpikler, kaş ve sakal da bu durumdan etkilenebilir [176].



Şekil 2. 12 Yüzdeki vitiligo lezyonları [173]

Aşağıdaki sınıflandırmaya göre vitiligonun lokalize, jeneralize ve genel olmak üzere üç genel tipi mevcuttur.

1. Lokalize

- a. Fokal: Bir alanda bir ya da daha fazla lezyon, ancak segmental bir dağılım yok.
- b. Segmental: Vücudun tek tarafında yer alan bir ya da daha fazla lezyon.

2. Jeneralize

- a. Vulgaris: Geniş bir alana dağılmış yaygın lezyonlar (vücut yüzey alanının % 80'ini etkiler).

b. Akrofasiyal: Ekstremitelerde ve yüzde çeşitli lezyonlar.

3. Genel

Vücut yüzey alanının % 80'inden fazla etkilenmiş.

Vitiligonun gidişatı öngörülememekte olup, hastalık uzun bir süre stabilize kalabildiği gibi hızla şiddetlenebilir. Özellikle yaz aylarında kendiliğinden repigmentasyon bildirilmiştir. Bazı hastalar stresli dönemlerde yeni lezyonların geliştiğini rapor etmiştir. Vitiligo tedavisinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [177-180].

Topikal kortikosteroidler, topikal kalsinörin inhibitörleri (takrolimus ve pimekrolimus), fototerapi (dar bantlı UVB, fotokemoterapi), eksimer lazer ve cerrahi (mini greft, vakum blister epidermal grefti, kültüre edilmiş otolog melanosit grefti ve kültüre edilmemiş epidermal hücre süspansiyonlarının grefti) gibi yöntemler tedavide kullanılmaktadır. Yüzdeki lezyonlarda ve koyu tenli hastalarda tedaviye daha iyi yanıt alınmaktadır [173].

b) Postinflamatuvar Hipomelanozis

Kutanöz inflamasyon, rezidüel hipopigmente lezyonların ortaya çıkmasıyla sonuçlanan, cilt rengini düzenleyen çeşitli yolakları değiştirebilir. Sedef hastalığı, seboreik dermatit, atopik dermatit, sarkoidoz, mikozis fungoides ve lupus gibi pek çok dermatoz, postinflamatuvar hipopigmentasyona yol açabilmektedir. Postinflamatuvar hipopigmentasyon lezyonları genellikle yavaş yavaş gider. Dirençli vakalarda, UVB fototerapi ve epidermal ya da melanosit grefti tedavide yardımcı olabilir [173].

c) Pityriasis alba

Pityriasis albanın patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olsa da postinflamatuvar hipomelanozis sınıfına dahil olan ve çok yaygın görülen bir hastalıktır. Bu hastalık her iki cinsten eşit oranda ve sıklıkla atopik çocuklarda ve gençlerde görülmektedir. Başlıca yüzde, özellikle de yanaklarda simetrik olarak dağılım gösteren çoklu maküller ve yamalar ile karakterizedir. Lezyonlar, çoğunlukla koyu tenli kişilerde, sınırları keskin olmayan soluk pembe veya açık kahverengi hipopigmente yuvarlak bir maküldür. Kendiliğinden düzelmeden önce aylarca ya da yıllarca devam edebilir [173].

Kepeklenmenin varlığı pityriasis versicolorda indikatiftir. Ancak, bu kepeklenme genellikle ince ve genellikle lezyonlarda kaşınma görülene kadar belirgin değildir.

Bu durum tipik olarak adolesanların ve genç yetişkinlerin gövdelerinde, ergenlik dönemi başladıktan sonra sebasöz bezlerin daha aktif hale gelmesiyle meydana gelir [172]. Histolojik olarak, epidermiste azalmış melaninle birlikte subakut spongiotik dermatit vardır. Emolyentlerden daha etkin bir tedavi seçeneği bulunmamaktadır [173].

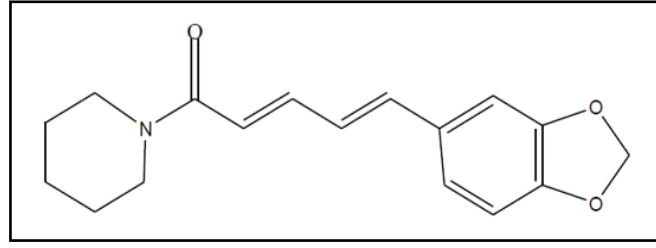
d) Piebaldizm

Piebaldizm, poliosis ve sınırlı stabil lökoderma ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır [173]. Piebaldizm, saç ve derinin etkilenen bölgelerinde melanosit yokluğu ile karakterize otozomal dominant geçişli nadir bir hastalıktır. Irk ayrımı göstermez, her iki cins de eşit olarak etkilenir. Nadir görülen bu hastalık, embriyonik yaşam sırasında melanoblastların diferansiasyonunu ve migrasyonunu etkileyen c-kit geninin mutasyonu sonucu gelişmektedir. Poliosis ve etkilenmiş bölgelerde melanositlerin yokluğuna bağlı gelişen sınırlı stabil lökoderma ile karakterizedir [181].

Piebaldizm, doğumdan itibaren yer alır ve sabittir. Bunun aksine, vitiligo genellikle doğumda ortaya çıkmaz ve oluşuktan sonra genişleyerek yayılır. Piebaldizmde deri lezyonlarına nadir olarak heterokromi ve sağırlık eşlik edebilir. Dolayısıyla piebaldizm tanısı, klinisyen için; Waardenburg sendromu ve Woolf sendromu açısından uyarıcı olmalıdır. Hastalar mutlaka görme ve duyma muayeneleri ile değerlendirilmelidirler [169].

2.3.5 Piperin

Piper longum L. (uzun biber) ve *Piper nigrum* L. (karabiber) (Piperaceae), geleneksel olarak Hint tıbbında ve genel olarak bir baharat olarak kullanılmaktadır. Piperin, karabiberdeki oleoresinden elde edilen, *Piper longum* L. ve *Piper nigrum* L.'nin acı tadını veren bir alkaloiddir [182] (Şekil 2. 13).



Şekil 2. 13 Piperinin moleküler yapısı [183]

Piperin, karabiberin % 5-7'sini oluşturmaktadır. Bu bileşen çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir [11].

2.3.5.1 Piperinin Fizikokimyasal Özellikleri

Fiziksel durumu: Kirli beyaz, sarı, kahve renkli kristalin toz

Moleküler formülü: $C_{17}H_{19}NO_3$

IUPAC ismi: (2E,4E)-5-(1,3-benzodioksol-5-yl)-1-piperidin-1-ilpenta-2,4-dien-1-on

Diğer isimleri: 5-(3,4-Metilendioksifenil)-2,4-pentadienoil-2-piperidin

Piperoilpiperidin

Bioperin

Molekül Ağırlığı: 285,33766 g/mol

Erime Derecesi: 130 °C

logP: 3,5

Yoğunluk: 1.193 g/cm³

Sudaki çözünürlük: 40 mg/L

Solventlerdeki çözünürlüğü: Asetik asit, benzen, etanol ve kloroform içinde çözünür.

Eter içinde az çözünür [59].

2.3.5.2 Piperinin Biyolojik Aktiviteleri

a) Antidepresan Aktivite

Yürütülen bilimsel bir çalışmada, Song ve ark.ları (2007), kronik hafif stres prosedürüne maruz bırakılan farelerde piperinin antidepresan etkisini araştırmıştır. Piperinin 2,5, 5 ve 10 mg/kg dozlarda 14 gün boyunca tekrarlanan uygulaması, sukroz tüketimi, plazma kortikosteron seviyesi ve açık alan aktivitesindeki değişikliklerle indüklenen kronik stresi ortadan kaldırmıştır. Buna ilaveten, piperin tedavisi ile hipokampal progenitör hücrelerin proliferasyonundaki azalma ve kronik stresli farelerin hipokampüsünde beyin kökenli nörotrofik faktörün seviyesinde iyileşme gözlenmiştir [184].

b) Biyolojik Aktiviteyi Arttırıcı

Kulkarni ve ark.ları (2008), piperinin (2.5 mg/kg, intraperitoneal) kurkumin (20 and 40 mg/kg, intraperitoneal) ile eş zamanlı olarak uygulanmasını araştırmıştır. Sonuçta, antidepresan aktivitelerde kuvvetlenme meydana gelmiştir [185].

Vladimir ve ark.ları (1999), piperinin (5 mg) eş zamanlı uygulanmasının serum β -karoten konsantrasyonu üzerine etkisini 14 gün boyunca sağlıklı gönüllülerde araştırmıştır. Sonuçlar, piperinle desteklendiğinde, serum β -karoten konsantrasyonunda, yalnızca β -karoten içeren plaseboya kıyasla anlamlı bir artış ($p < 0.0001$) olduğunu göstermiştir. β -karotene piperin ilavesi, plaseboya kıyasla eğri altı alanda % 60'lık bir artış meydana getirmiştir [186].

Bhutani ve ark.ları (2009), kurkuminin piperinle kombinasyonunun antidepresan etkisini araştırmıştır. Piperinin (2.5 mg/kg, intraperitoneal, 21 gün), kurkuminle kombinasyonunun (20 and 40 mg/kg, intraperitoneal), kurkuminin anti-immobilite, nörotransmitter (serotonin ve dopamin) arttırıcı ve monoamin oksidaz inhibitörü (MAO-A) etkilerini kurkumine kıyasla anlamlı ölçüde arttırdığı sonucuna varılmıştır [185].

Lambert ve ark.ları (2004), piperin (70.2 μ mol/kg, per oral), (-)-Epigallokateşin-3-gallat (163.8 μ mol/kg, per oral) ile birlikte, erkek CF-1 farelere uygulandığında, yalnızca (-)-Epigallokateşin-3-gallatın uygulanmasına kıyasla plazma C(max) ve eğri altı alanı 1,3 kat daha arttırdığını bildirmiştir. Bu olay, glukuronidasyon ve gastrointestinal geçişin inhibe edilmesine dayandırılmaktadır [187].

c) Apoptozis İnhibisyonu

Choi ve ark.ları (2007), piperinin (10-100 μ M), House Ear Enstitüsü-Organ of Corti-1 hücrelerini (HEI-OC1), sisplatin ile indüklenen apoptozise karşı, heme oksijenaz-1 ekspresyonunun indüksiyonu aracılığıyla zamana ve doza bağlı olarak koruduğunu ispatlamıştır [188].

d) Genotoksisite

Selvendiran ve ark.ları (2005), benzo(a)piren ve siklofosamid ile mikronukleus oluşumunda supresyon meydana geldiğini (% 33,9-66,5) ortaya koymuştur. Bu durum, piperinin farelerde 25, 50 ve 75 mg/kg dozlarda oral yoldan uygulanmasını takiben azalmıştır [189].

e) Antioksidan

Selvendiran ve ark.ları (2005), piperinin, DNA hasarı ve glutatyon transferaz, kinon reduktaz ve UDP-glukuronosil transferaz gibi detoksifiye edici enzim aktiviteleri üzerine koruyucu etkisini benzo(a)piren ile indüklenmiş akciğer kanserli hayvanlar üzerinde araştırmıştır.

Sonuçta, piperin desteğinin (50 mg/kg, vücut ağırlığı), detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinde artışa ve tek hücre elektroforezi ile saptanan DNA hasarında azalmaya yol açtığını gözlemlemiştir [190].

f) Anti-platelet Aktivite

Park ve ark.ları (2007), Piper longum L.'nin meyvelerinden, dört adet asit amit (piperin, pipernonalin, piperoktadekalidin ve piperlongumin) izole etmiş ve bunların inhibitör etkilerini, kolajen, araşidonik asit, platelet aktive edici faktör ve trombin ile indüklenmiş, yıkanmış tavşan trombosit agresyonu üzerinde araştırmıştır. Sonuçta, trombin ile indüklenenin haricinde platelet agregasyonu üzerinde doza bağlı inhibitör aktivitelerinin olduğu gösterilmiştir [191].

g) Antiinflamatuvar Aktivite

Pradeep ve ark.ları (2004), piperinin 2,5, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda, B16F melanoma hücrelerinin kollajen matriks invazyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiklerini göstermiştir. Ayrıca, piperinin, interlökin-1β, interlökin-6, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi proinflamatuvar sitokinleri azalttığı tespit edilmiştir [192].

h) Antihipertansif Etki

Taqvi ve ark.ları (2008), intavenöz uygulanan piperinin, normotansif anestezi uygulanmış farelerde ortalama arteriyal basıncı doza bağlı olarak (1-10 mg/kg) azalttığını gözlemlemiştir [193].

i) Hepatoprotektif Etki

Matsuda ve ark.ları (2008), piperini metanolik ekstraktan izole etmiştir. Çalışmada, piperinin, D-galaktozaminle indüklenen karaciğer toksisiteli farelerde, doza bağlı olarak serum GPT (glutamik pirüvik transaminaz) ve GOT (glutamik-oksaloasetik transaminaz) seviyelerindeki yükselmeyi inhibe edebildiği sonucuna varılmıştır. Bu inhibitör etki, hepatositlerin TNF-α'ya olan duyarlılığının azalmasına dayandırılmıştır [194].

i) Antitiroid Aktivite

Panda ve ark.ları (2003), erişkin erkek İsviçre albino farelere 15 gün boyunca peroral yoldan 0,25 ve 2,5 mg/kg/gün piperin uygulamıştır. Çalışmada, 2,5 mg/kg dozda piperin uygulanmasıyla, tiroid hormonlarından hem tiroksinin (T4) hem de triiyodotironinin (T3) serum seviyelerinde azalma meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca, hepatik 5'D enziminde ve glukoz-6-fosfataz aktivitesinde azalmanın eşlik ettiği glukoz konsantrasyonlarında bir düşüş gerçekleşmiştir. Ancak, 0,25 mg/kg dozda piperin uygulanan hayvanlarda, serum T3 konsantrasyonunun inhibisyonu haricinde diğer araştırılan aktivitelerde anlamlı değişiklikler gözlemlenmemiştir [195].

j) Antitümoral Aktivite

Duessel ve ark.ları (2008), piperinin 24 saatte antiproliferasyon etkisi gösterdiğini gözlemlemiştir. Bu etki, 48 ve 72 saatte 100-200 µM konsantrasyonda insan kolon kanseri hücre kültüründe (DLD-1) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [196].

k) Antiastmatik

Kim ve ark.ları (2009), Balb/c fare hücrelerinde ovalbuminle astımı indüklemiş ve tedavi amacıyla 8 hafta boyunca haftada 5 kez oral yoldan piperin (4,5 and 2,25 mg/kg) uygulamıştır. Sonuçta, piperin uygulanan gruplarda, interlökin-4, interlökin-5, immünoglobülin E ve histamin üretiminin baskılanmasıyla, eozinofil infiltrasyonu, alerjik solunum yolu inflamasyonu ve solunum yolu duyarlılığında iyileşme gözlenmiştir [197].

2.3.5.3 Piperinin Pigmentasyon Üzerine Etkisi

Melanositler pigment hücreleridir. Bu hücreler vitiligo gibi cilt rahatsızlıklarında fonksiyonel epidermal melanositlerin kaybı nedeniyle büyük ölçüde yok olmaktadır. Bu nedenle de deride depigmente olmuş lezyonlar meydana gelmektedir [12] (Şekil 2. 14).



Şekil 2. 14 Vitiligonun neden olduğu düzensiz cilt, saç ve kirpikte görülen depigmente lezyonlar [59]

Günümüzde bu hastalığın tedavisinde kullanılan yöntemler; cilde kortikosteroidlerin uygulanmasını ve cilt pigmentasyonunu yeniden kazandırmak için UV radyasyon kullanılarak uygulanan fototerapiyi içermektedir [5].

Ancak bu tedavi yöntemlerinin uzun vadede birçok yan etkisinin olduğu ve her zaman etkili olmadığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalarda, özellikle kortikosteroid tedavisinin uygulandığı hastaların %25'inden daha azında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. UV radyasyon ile tedavide ise; lekeli ve düzensiz bir pigmentasyon elde edilirken, uzun vadede cilt kanserine yol açma riski söz konusudur [6, 7].

Hastalığın tedavisinde, dünyada kabul gören mevcut etkili bir yöntemin olmaması, hastalarda kozmetik ve psikososyal sorunlar oluşturarak kişinin yaşam kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bazı araştırmacılar, vitiligoda inaktif melanositlerin depigmente yamalar içerisinde kaldığını öne sürmektedir. Bu nedenle tedavi, tirozinazı reaktif etmeye ve böylelikle melanin sentezini düzenlemeye yönelik tasarlanabilir [198, 199]. Son zamanlarda immünohistokimyasal yöntemler ve taramalı elektron mikroskopu ile elde edilen bulgular, melanositlerin vitiligo maküllerinde kaybolduğunu göstermektedir.

Bu nedenle, tedavide bu hücrelerle lezyonlarda repopülasyonun sağlanması üzerine odaklanılmalıdır [200-202]. Birçok durumda, geleneksel bitkisel tedavilerle, özellikle de geleneksel Çin tıbbı ve Hint Ayurvedik tıbbı ile olumlu sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir [13].

Vitiligo için geleneksel bitkisel tedavilerden olan PUVA'da (psoralen ve UVA) *Psoralea corylifolia* L.'den elde edilen psoralenler ve KUVA'da (khellin ve UVA) *Ammi visnaga* L.'den elde edilen khellin kullanılmaktadır [203]. Bu nedenle, geleneksel olarak kullanılan diğer bitkilerin sistematik taraması yapılarak vitiligo için yeni tedavi ajanlarının elde edilmesi akılcı bir yoldur. Özellikle, cilt kanseri ile ilişkili olduğundan, UV radyasyon ile aktive edilmeyi gerektirmeyen bileşenler avantaj sağlayacaktır [204, 205].

Melanosit proliferasyonunu stimüle ediciler, depigmentasyon rahatsızlıklarının tedavisinde potansiyel tedavi ediciler olarak ilgi görmektedir. King's College London'dan bir grup bilim adamı, karabibere onun baharatlı, keskin tadını veren temel alkaloid piperini keşfetmişlerdir. Piperin ve sentetik türevlerinin cilt pigmentasyonunu stimüle ettiğini ve ciltte pigmentasyonun tekrar sağlanmasında etkili olduğunu göstermişlerdir [7].

Soumyanath ve ark.ları tarafından yürütülen çalışmada, piperin in vitro ortamda melanosit proliferasyonunu arttırmıştır. Piperinin, protein kinaz C stimülasyonu yoluyla etki ettiği gösterilmiştir. tarafından piperinin in vivo pigmentasyonu stimüle ettiği ispatlanmıştır [12].

Yapılan diğ er bir çalışmada, piperinin sulu ekstresi (0,1 mg/ml) ile 8 gün içinde fare melanosit hattı kültürünün büyümesinin yaklaşık %300 oranında uyarılmasının sağlandığı gözlenmiştir [13].

Bu bulgular, daha iyi sonuçlar elde etmenin yanında potansiyel tedavilerin geliştirilmesine yol açabilir. Ayrıca vitiligo tedavisinde UV radyasyona duyulan ihtiya ı azaltarak deri kanseri riskini de düşürebilir.



MATERYAL VE METOD**3.1 Deneylerde Kullanılan Malzemeler ve Ekipmanlar****3.1.1 Kullanılan Kimyasallar**

Deneyisel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri Çizelge 3. 1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1 Deneyisel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Piperin	Sigma-Aldrich	P49007
DL-alfa tokoferol asetat	Sigma-Aldrich	T3376
İzodesil neopentanoat (DUB VCI 10)	Stearinerie Dubois	60209-82-7
Undesil alkol (Sensiva® PA 30)	Schülke	
Yüksek düzeyde saflaştırılmış, dietilen glikol monoetil eter, EP/NF (Transcutol HP)	Gattefosse	3265 / 5
Kaprilik / kaprik trigliserit (Labrafac Lipophile WL 1349)	Gattefosse	3139 / 7

Çizelge 3. 1 Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (devamı)

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog No
Poli (etilen glikol) -blok-poli (propilen glikol) -blok-poli (etilen glikol) (Pluronic® F68)	Sigma-Aldrich	15759
Metanol	Merck	106007.2500
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Duchefa Biochemie	S0522
Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck	106574
Sodyum klorür	Merck	106404
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Affymetrix	298-93-1
Fosfat tamponu tableti	Sigma-Aldrich	P4417
Tripsin-EDTA (1X)	Gibco	25200056
Fetal Sığır Serum (FBS)	Gibco	16000044
Penisilin-Streptomisin	Gibco	15140122
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/F-12)	Gibco	10565018
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	CARLO ERBA	445103
Tripan Mavisi	Gibco	15250061

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

Sonics VC 750 Ultrasonik Homojenizatör

Witeg Homojenizatör

Malvern Zetasizer Nano ZS

Shimadzu UV 1601 UV Spektrofotometre

WTW inolab pH 720 pH-metre

Hanna İletkenlik Ölçer

Brookfield HA DV3T Reometre

Shimadzu Scanning Probe Microscope-SPM 9600

Nüve Soğutmalı Santrifüj

Bandelin Sonorex Ultrasonik Su Banyosu

Nüve TC120 İklimlendirme Kabini

Radwag AS220R2 Analitik Terazı

Sartorius CP 225D Hassas Terazı

ELGA Purelab Ultra Distile Su Cihazı

GFL Çalkalamalı Su Banyosu 1083

TEZSAN BIOSAFETY CABINET Class II Kabin

LEEC Precision 50 Culture Safe CO₂ Etüv

BEL INV-199-FL Floresans Mikroskop

Thermo Labsystems Multiskan Ascent Mikroplate Okuyucu

3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

3.2.1 Tetrazolium salt 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) Tamponu

10 mg/ml MTT çözeltisi için, 10 mg tetrazolyum tuzu 1 ml fosfat tamponunda çözündürölüp, 45 µm'lik filtre ile filtre edildi.

3.2.2 Sodyum Fosfat Tamponu

2,68 gram disodyum hidrojen fosfat heptahidrat (Na₂HPO₄.7H₂O), 0,156 gram sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH₂PO₄.2H₂O) ve 5,84 sodyum klorür tartıldı. 1 L distile su ile tamamlandı ve pH 7,4'e ayarlandı.

3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

3.3.1 Zeta Potansiyeli ve Damlacık Boyutu Ölçümü

Zetasizer cihazı sıvı ortamlardaki parçacıkların veya moleküllerin üç karakteristik özelliği olan büyüklük dağılımları, yüzey yükleri (zeta potansiyel) ve moleküler ağırlıklarını ölçmek için kullanılır. Büyüklük dağılımlarını dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS), moleküler ağırlıklarını statik ışık saçılması (Static Light Scattering, SLS), zeta potansiyelini ise lazer doppler elektroforez (Laser Doppler Electrophoresis, LDE) tekniği ile saptamaktadır [59].

Foton korelasyon spektroskopisi (PCS) olarak da bilinen DLS, tek bir dalga boyundan oluşan lazer ışını kullanılır. Tanecik boyutu ölçülmek istenen örnek, bir sıvı içerisinde uygun bir konsantrasyonda olacak şekilde dağıtılır. Işın demeti, hazırlanan örneğin üzerine gönderilir. Taneciklerin belirli bir açıda (genellikle 90° veya 173°) saçtığı ışık, dedektör tarafından toplanır. Dedektör çıkışında bulunan korelatör ile saçılımın şiddetine ait korelasyon fonksiyonundaki değişimden ortalama tanecik boyutu ve polidispersite indeksi bulunur. Bunun için kümülant metodu kullanılır [206].

Negatif yüklü bir parçacık, iyonlar içeren sıvı bir ortamda süspande edildiğinde parçacığın yanında olan zıt yüklü iyonlar parçacığa sıkıca bağlanırlar. İkinci tabaka olarak da zayıf bağlanan iyonlardan oluşur. Bu iki tabaka elektriksel çift tabakayı oluştururlar. Çözücü sıvı ile parçacık arasında bir potansiyel ortaya çıkar. Bu potansiyel, parçacık ile çözücü sıvısı arasındaki mesafeyle değişir. Bu potansiyel zeta potansiyel olarak adlandırılır.

Zetasizer cihazı, zeta potansiyel değerini parçacıkların elektroforetik hareketliliğini belirleyerek ve Henry eşitliğini kullanarak hesaplar. Elektroforetik hızları örnek üzerinde elektroforez deneylerinin yapılması ve parçacıkların hızlarının LDE tekniğiyle ölçümü sonucu elde edilir. Zeta potansiyelin büyüklüğü koloidal sistemlerde kararlılığın bir göstergesidir. Eğer süspansiyon içerisindeki parçacıklar çok büyük negatif veya pozitif zeta potansiyeline sahipse birbirlerini iterler ve çökme eğilimi göstermezler. Eğer küçük zeta potansiyel değerlerine sahipler ise bir araya gelme eğilimleri ve çökme olasılıkları yüksektir [59].

Bu tez çalışmasında Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılarak, hazırlanan NE'lerin ortalama damlacık boyutu, zeta potansiyeli ve Pdl değerleri saptanmıştır.

3.3.2 UV-VIS Spektroskopisi

UV spektrofotometre, çözelti içeriğindeki maddenin miktarının bulunmasında sıkça kullanılan bir çeşit fotometredir. Temel mantığı, hazırlanan çözeltiden belirli dalgaboylarında ışık geçirilmesi ve bu ışının ne kadarının çözelti tarafından absorblandığını (soğurulduğunu) bulması esasına dayanır. Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışın, çözelti tarafından soğurulur.

Spektrofotometre cihazının iç yapısında bulunan temel optik ve optik olmayan bileşenler aşağıdaki gibidir:

- Işık kaynağı (source): Solüsyon üzerine düşürülecek ışığın üretildiği lambadır. Genellikle kullanılan tungsten veya döteryum lambalardır. 200 nm ile 700 nm dalga boyları arasında ışık üretir.
- Giriş sliti: Sisteme sadece ışık kaynağından gelen ışığın ince bir hüzme halinde girmesini sağlayan küçük geçiş aralığıdır.
- Monokromatör: Sadece belli dalga boyundaki ışığın kuvvet üzerine düşürülmesini sağlar.
- Çıkış sliti: Diğer dalga boylarındaki ışığın kuvete ulaşmasını engelleyen geçiş aralığıdır.
- Kuvet: Renkli solüsyonun konduğu özel kuartz malzemeden yapılmış tüptür.
- Dedektör: Kuvet tarafından geçirilen ışığı ölçen birimdir.

UV Spektrofotometre, çözeltinin içinden geçebilen (çözelti tarafından absorblanmayan) ışığın yoğunluğu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi verir. Spektrofotometre sıvı içerisindeki herhangi bir madde yoğunluğunu ölçebilmektedir. Tıp, kimya, biyoloji, gıda sanayi, ilaç sektörü, çevre mühendisliği ve su ürünleri gibi alanlarda analizler için UV spektrofotometre sıklıkla kullanılmaktadır [59].

Bu tez çalışmasında hazırlanan nanoemülsiyonların piperin içeriği tayin etmek amacıyla UV spektroskopisi kullanılarak miktar tayini yöntemi belirlendi. Belirlenen bu yöntemin analitik validasyon çalışmaları yürütüldü. Bu yöntemle fizikokimyasal stabilite testlerinden biri olan etkin madde içeriği analiz edildi.

3.3.3 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

AFM, atomik boyutlara kadar sivriltilmiş bir iğne ucu yardımıyla, yüzeyin yüksek çözünürlükte, üç boyutlu görüntülenmesini sağlayan çok yüksek çözünürlüklü bir taramalı kuvvet mikroskobudur. Nano boyutta görüntüleme, ölçme ve malzeme işleme konusunda en gelişmiş araçlardan biridir [59].

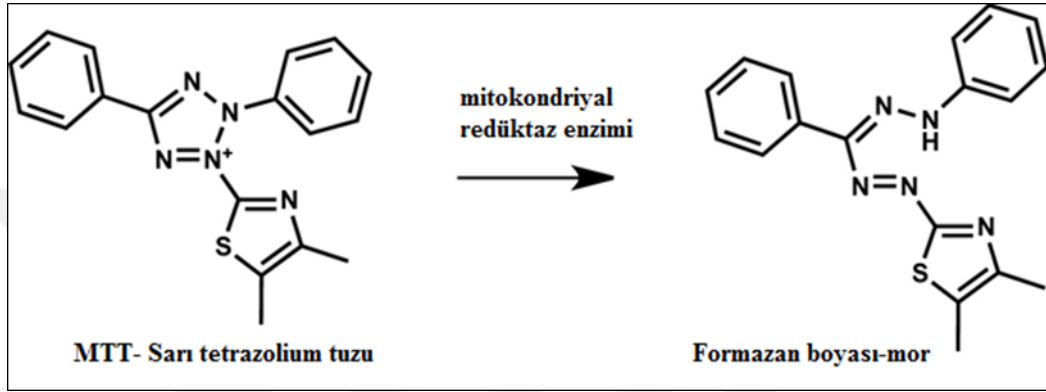
Bilgi, mekanik bir ucun yüzeydeki yükseltileri algılamasıyla toplanır. Elektronik kumanda üzerinde bulunan, küçük fakat hassas hareketleri sağlayan piezoelektrik öğeler, doğruluğu kesin ve hassas bir tarama sağlar. İletken manivelalar kullanmak suretiyle numune yüzeyindeki elektrik potansiyeli de taranabilir. Cihazın daha yeni ve gelişmiş versiyonlarında, elektriksel iletkenliği ya da yüzeydeki elektron iletimini algılamak için uçtan akım geçirilmektedir. AFM esnek bir manivela ve buna bağlı “tip” adı verilen yüzeyi sivri bir uçtan oluşur.

Manivela çeşitli amaçlar için çeşitli malzemelerden üretilse de genellikle silikon veya silikon nitrürdür. Malzeme ile temas halinde, hareketli uç ile malzeme arasında nanonewton büyüklüğünde kuvvet uygulanır ve bu kuvvet sabit tutulur. Böylece gezici uç herhangi bir engel veya çıkıntı ile karşılaştığında söz konusu kuvveti dengelemek için hareket eder ve kuvveti sabitler. Böylece yüzeyin 3 boyutlu görüntüsünü çıkarmak mümkündür [59]. Bu tez çalışmasında AFM ile piperin içeren NE’lerin boyut ve yüzey analizleri yapılmıştır.

3.4 Hücre Kültürü

Hücrelerde toksisiteyi incelemek amacıyla hücre canlılığının ölçülmesini sağlayan ve yaygın olarak kullanılan metotlardan biri MTT testidir. Hücre büyümesi veya hücre ölümü; MTT testi ile indirekt olarak değerlendirilir. Kültür ortamında hücrelere uygulanabilen ve hücrelerin metabolik aktivitesinin ölçülmesine olanak sağlayan kolorimetrik bir yöntemdir. Sarı renkli MTT reaktantının, hücrelerin mitokondrilerindeki

dehidrojenaz enzimi ile indirgenmesi sonucu ürün olarak mor renkli formazan kristalleri oluşur (Şekil 3.1). Bu reaksiyon sadece canlı hücrelerde gerçekleşen kimyasal bir olaydır. Oluşan formazan kristalleri, mikroskopik olarak gözlemlenebilir ve DMSO, izopropanol gibi kimyasallar ile çözündürülerek mor renk kolorimetrik olarak ölçülebilir. Mor renkli ürünün toplam miktarı hücrelerdeki dehidrojenaz enziminin toplam aktivitesini verir. Ölçülen kolorimetrik değer hücrelerin canlılığı ile doğrudan orantılıdır [207].



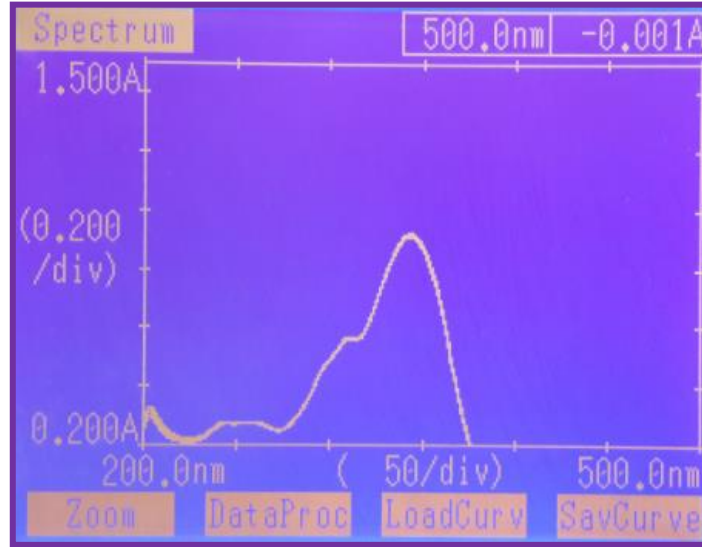
Şekil 3.1 MTT reaktanının mor renkli formazan kristaline indirgenmesi [59]

Bu tez çalışmasında oluşturulan nanoemülsiyonların toksik etkisi L929 Fare fibroblast hücre hattı kullanılarak MTT yöntemi ile incelenmiştir.

DENEYSEL KISIM**4.1 UV-VIS Spektrofotometre ile Analitik Validasyon**

Hazırlanan formülasyonların stabilite çalışmalarında ilaç içeriklerinin saptanması amacıyla etkin madde analizi için metanolde 0,5 mg/ml konsantrasyonda piperin çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltinin maksimum absorbands değeri 200 ila 500 nm arasındaki dalga boylarının dâhil olduğu bölgede spektrum taraması yapılarak UV spektrofotometresi kullanılarak belirlendi.

0,5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan piperin çözeltisinin maksimum absorbands değeri verdiği dalga boyu Şekil 4.1'deki UV spektrumunda görülmektedir.



Şekil 4. 1 Metanolde çözündürülmüş piperine ait UV spektrumu

Sonuçların değerlendirilmesinde ise etkin maddenin verdiği absorbandslar kullanıldı. Yöntemin güvenilirliğini belirlemek için de analitik yöntemin validasyon çalışması

yapıldı. Analitik yöntem validasyonu, bir test yönteminin kesin ve doğru olarak her zaman bekleneni gerçekleştirmesinin kanıtlanmasıdır. Kullanılan analitik yöntemlerin validasyonu için, doğrusallık (linearity), doğruluk (accuracy), kesinlik (precision) ve stabilite (stability) parametreleri literatüre göre çalışıldı.

4.1.1 Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, belirlenen aralıkta elde edilen test sonuçlarının test içindeki ilgili madde ve/veya etken madde konsantrasyonu ile doğru orantıya sahip olmasıdır.

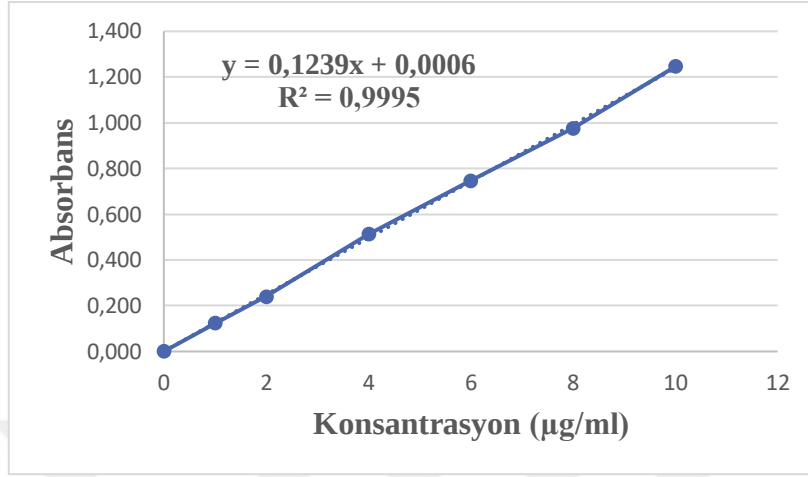
Piperinin metanolde 0,5 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 0,2 ml alınarak metanol ile 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0,02 ml, 0,04 ml, 0,08 ml, 0,12 ml, 0,16 ve 0,2 ml alındı ve metanol çözeltisi ile 10 ml'ye seyreltildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Analitik yöntemin doğrusallık ölçümü için hazırlanan çözeltiler

Hazırlanan çözeltiler, en yüksek absorbands değeri verdiği 343,4 nm'de metanole karşı okundu. Çözeltilerin konsantrasyonlarına karşı absorbands değerleri kullanılarak kalibrasyon doğrusu hazırlandı. Ayrıca doğru denklemi belirlendi ve determinasyon katsayısı (r^2), standart sapma (SS) ve % relatif standart sapma (% RSD) değerleri hesaplandı. Hesaplamalarda aynı şekilde çalışılan 3 deneyin absorbandslarının ortalaması kullanıldı.

Kalibrasyon doğruşu grafiğı ve kalibrasyon doğruşunun çizilmesinde ortalama absorbanslar, SS ve %RSD sonuçları ise aşığıda yer alan Şekil 4.3'te ve Çizelge 4. 1'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 3 Piperinin kalibrasyon doğruşu grafiğı

y : Absorbans

x : Konsantrasyon (µg/ml)

R²: Determinasyon katsayısı

Çizelge 4. 1 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğruşallığına ait bulgular (n=3)

KONSANTRASYON (µg/ml)	Ortalama Absorbans	SS	% RSD
1	0,126	0,004	1,317
2	0,240	0,001	0,393
4	0,513	0,004	0,694
6	0,747	0,001	0,109
8	0,976	0,002	0,251
10	1,246	0,001	0,076

4.1.2 Doğruluk

Doğruluk, örnek içindeki analiz edilecek maddenin hazırlanan konsantrasyonu ile tayin neticesinde bulunan konsantrasyonunun birbiri ile uyum yakınlığını ifade etmektedir. Çalışma derişiminin % 50 (3 µg/ml), % 100 (6 µg/ml) ve % 150'sini (9 µg/ml) içerecek şekilde üçer paralel numune hazırlanarak analiz edildi ve elde edilen sonuçların kabul kriterlerine uygunluğu kontrol edildi. Doğrusallık çalışmasında elde edilen doğru denklemi vasıtasıyla absorbans değerlerinden çözeltilerdeki piperin konsantrasyonu hesaplandı. Yöntemin doğruluğu ise % geri kazanım, SS ve % RSD değerlerinin hesaplanması ile belirlendi. Piperinin spektrofotometrik miktar tayini yöntemine ait doğruluk bulguları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 2 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin doğruluğuna ait bulgular (n=3)

% Konsantrasyon	İlave edilen miktar	Bulunan miktar (µg/ml)	% Geri kazanım	Ort. % Geri kazanım	SS	% RSD
50	3 µg/ml	2,978	99,274	99,453	0,888	0,893
		2,954	98,467			
		3,019	100,619			
100	6 µg/ml	6,021	100,350	100,888	0,396	0,393
		6,061	101,022			
		6,077	101,291			
150	9 µg/ml	9,072	100,798	100,828	0,112	0,111
		9,064	100,708			
		9,088	100,977			

4.1.3 Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, aynı homojen örnekten yapılan ardışık örneklemelerden elde edilen ölçüm serileri arasındaki uyumun yakınlığı olarak tarif edilir. Yöntemin kesinliği için % RSD değeri % 2 den küçük olmalıdır.

4.1.3.1 Gün İçi Kesinlik

Örnek hazırlama aşamalarından gelecek hatalardan bağımsız olarak sistem performansının bir ölçütüdür. Piperinin metanolde 0,5 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0,12 ml (% 100'lük test konsantrasyonu) alınarak metanol çözeltisi ile 10 ml'ye seyreltildi ve art arda 6 okuma yapıldı. Doğru denklemi yardımıyla piperin miktarı hesaplandı ve sonuçların ortalamaları, SS ve % RSD değerleri hesaplandı. % RSD değerinin % 2'den küçük olup olmadığı tespit edildi. Piperinin spektrofotometrik miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları Çizelge 4. 3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 3 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin gün içi kesinliğine ait bulgular (n=3)

% Konsantrasyon	Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	Absorbans	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)
100	6 µg/ml	0,746	6,013
100	6 µg/ml	0,747	6,021
100	6 µg/ml	0,749	6,037
100	6 µg/ml	0,752	6,061
100	6 µg/ml	0,741	5,973
100	6 µg/ml	0,756	6,094
		Ortalama	6,033
		SS	0,038
		% RSD	0,631

4.1.3.2 Günler Arası Kesinlik

Birinci gün içinde yapılan gün içi kesinlik çalışmaları aynı şekilde 2. ve 3. günlerde de tekrar yapıldı. Birinci, ikinci ve üçüncü gün sonuçlarının ortalamaları, SS ve % RSD değerleri hesaplandı. % RSD değerinin % 2’den küçük olup olmadığı tespit edildi.

Piperinin spektrofotometrik miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları izelge 4. 4’te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 4 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin günler arası kesinliğine ait bulgular (n=3)

% Konsantrasyon	Teorik Konsantrasyon	Pratik Konsantrasyon (µg/ml)		
		1.gün	2.gün	3.gün
100	6 µg/ml	6,013	6,024	6,052
100	6 µg/ml	6,021	6,049	6,024
100	6 µg/ml	6,037	6,028	6,078
100	6 µg/ml	6,061	6,047	6,060
100	6 µg/ml	5,973	6,019	6,033
100	6 µg/ml	6,094	6,062	6,083
	Ortalama	6,033	6,038	6,055
	SS	0,038	0,015	0,022
	% RSD	0,631	0,256	0,356

4.1.4 Stabilite

Etkin maddenin analiz ve stabilite çalışmaları sürecinde dayanıklılığını ispatlamak amacıyla stabilite çalışması yapıldı. Piperinin metanolde 0,5 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözeltiden 0,12 ml (% 100’lk test konsantrasyonu) alınarak metanol ile 10 ml’ye seyreltildi.

Piperinin metanoldeki çözeltisi 25°C’de, 8 saat boyunca bekletildi. 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7 ve 8. saatlerde alınan örneklerin absorbansları ölçüldü. Absorbans oranları kullanılarak piperin konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik olup olmadığı tespit edildi. Metotlarda anlatıldığı şekilde 8 saat boyunca metanol içerisindeki etkin maddenin stabilitesi incelendi. Elde edilen sonuçların % RSD’sinin % 2’nin altında olmasından dolayı piperinin 8 saat boyunca stabil olduğu tespit edildi. Stabilite bulguları Çizelge 4. 5’te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 5 Piperinin spektrofotometrik yöntem ile miktar tayininin stabilitesine ait bulgular (n=3)

Ölçüm Zamanı (Saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/ml)
1	6	6,038
2	6	6,024
3	6	6,092
4	6	5,987
5	6	6,025
6	6	5,994
7	6	6,019
8	6	6,022
	Ortalama	6,025
	SS	0,030
	% RSD	0,495

4.2 Ön Formülasyon Çalışmaları

4.2.1 Hazırlanacak Formülasyon İçeriklerinin ve Üretim Prosesinin Optimize Edilmesi

Etkili bir emülsifikasyon prosesi, NE'lerin istenilen boyut aralığında ve dar bir damlacık büyüklüğü dağılımına ($<0,2$) sahip olmasını sağlar. Bu özelliklerin optimizasyonunda formül bileşenleri ve konsantrasyonlarının önemi büyüktür. Bunun için surfaktan (Pluronic® F68), kosurfaktan (Transcutol® HP) ve yağ fazı bileşenleri ile bunların konsantrasyonları seçilerek çeşitli nanoemülsiyonlar hazırlandı. Ayrıca, seçilen üretim metodu olan ultrasonik emülsifikasyon yöntemine ait parametrelerin optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu kapsamda ön denemelerde 20 adet formülasyon hazırlandı. Yağ fazı toplamda, %7,5 (a/a) oranında olacak şekilde ayarlandı. Denemelerde kullanılmak üzere non-iyonik surfaktan Pluronic F® 68 (%5 a/a) seçildi. Kosurfaktan olarak %10 (a/a) Transcutol® HP kullanıldı. Yağ fazı: Smix (surfaktan+kosurfaktan miktarı) oranı 1:2 olarak seçildi. Ön denemelerde hazırlanan formülasyonların içeriği Çizelge 4. 6'da gösterilmektedir.

Çizelge 4. 6 Belirlenen formülasyon içeriği

BİLEŞENLER	FORMÜLASYONLAR									
(%a/a)	PL-F1P1	PL-F1P2	PL-F2P1	PL-F2P2	PL-F3P1	PL-F3P2	PL-F4P1	PL-F4P2	PL-F5P1	PL-F5P2
YAĞ FAZI										
Piperin	0,01 5	0,015	0,03	0,03	0,15	0,15	0,3	0,3	0,6	0,6
DL-alfa tokoferol asetat	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
İzodesil neopentanoat (DUB VCI 10)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Çizelge 4. 6 Belirlenen formülasyon içeriği (devamı)

BİLEŞENLER	FORMÜLASYONLAR									
(%a/a)	PL-F1P1	PL-F1P2	PL-F2P1	PL-F2P2	PL-F3P1	PL-F3P2	PL-F4P1	PL-F4P2	PL-F5P1	PL-F5P2
Undesil alkol (Sensiva® PA 30)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Kosurfaktan (Transcutol HP)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Kaprilik/kaprik trigliserid (Labrafac Lipophile WL 1349)	4,28 5	4,285	4,27	4,27	4,15	4,15	4	4	3,7	3,7
SU FAZI										
Pluronic® F68	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Su fazı ve yağ fazı bileşenleri ayrı beherlerde tartıldıktan sonra birleştirildi. Birleştirilen karışım, damlacık çapını küçültmek için yoğun parçalayıcı kuvvetler oluşturan sonikatör kullanılarak istenilen boyuta küçültüldü. Enerji girişi, piezoelektrik kristal taşıyan bir sonotrot aracılığıyla verildi. Sonikatörün probu simetrik şekilde kaba emülsiyona daldırıldı ve sonikasyon prosedürü belirlenen süre boyunca gerçekleştirildi. Üretimde aşağıdaki 4 farklı proses denendi:

Prosedür 1 (P1)= Ön karıştırmasız, 20 dakika ultrasonikasyon.

Prosedür 2 (P2)= Ön karıştırma (mekanik karıştırıcı), 5 dakika, 8100 rpm + 20 dakika ultrasonikasyon.

Prosedür 3 (P3)= Ön karıştırmasız, 30 dakika ultrasonikasyon.

Prosedür 4 (P4)= Ön karıştırma (mekanik karıştırıcı), 5 dakika, 8100 rpm + 30 dakika ultrasonikasyon.

Ultrasonikasyon işleminde fazla ısınmayı engellemek amacıyla cihaz 30 s çalıştırılıp, 30 s dinlendirildi. Bant genişliği %50'ye sabitlendi.

4.2.2 Hızlandırılmış Stabilit  Testleri

Formülasyonların kinetik ve termodinamik stabilitelerini değerlendirmek amacıyla hızlandırılmış stabilit  testleri olan santrifüj ve termal stres testleri yürütüldü.

4.2.2.1 Santrifüj Testi

5 g'lık numunelere, 25 1 C'de 3500 rpm hızda 30 dakika boyunca santrifügasyon uygulandı. Makroskobik inceleme yapılarak, herhangi bir faz ayrımı veya bulanıklaşma görülmeyen formülasyonlar saptandı.

4.2.2.2 Termal Stres Testi

5 g'lık numuneler termostatik su banyosunda farklı sıcaklıklara (40 C'den 80 C'ye kadar, 5 C'lik sıcaklık aralıklarında) maruz bırakıldı.  r n her sıcaklık noktasında 30 dakika tutulduktan sonra makroskobik inceleme yapılarak, herhangi bir faz ayrımı veya bulanıklaşma görülmeyen formülasyonlar saptandı. Uygulanan hızlandırılmış stabilit  testleri sonucu formülasyonların görünümü hakkında elde edilen veriler  izelge 4. 7'de gösterildi. Bu testler sonucunda sedimentasyon probleminin görüldüğü F4P1, F4P2, F5P1, F5P2, F4P3, F4P4, F5P3 ve F5P4 formülasyonları elenerek, ileriki çalışmalara hızlandırılmış stabilit  testlerinden geçen formülasyonlarla devam edildi.

Çizelge 4. 7 Hızlandırılmış stabilit  testleri sonucu elde edilen veriler

Formülasyon Kodu	Görünüm	
	Termal Test	Santrifüj Testi
F1P1	(H); (-)	(H); (-)
F1P2	(H); (-)	(H); (-)
F2P1	(H); (+)	(H); (-)
F2P2	(H); (-)	(H); (-)

Çizelge 4. 7 Hızlandırılmış stabilite testleri sonucu elde edilen veriler (devamı)

Formülasyon Kodu	Görünüm	
	Termal Test	Santrifüj Testi
F3P1	(H); (+++)	(H); (-)
F3P2	(H); (++++)	(H); (-)
F4P1	(H); (+++)	(H); (-)
F4P2	(H); (+++++)	(H); (+++++)
F5P1	(H); (+++)	(H); (+)
F5P2	(H); (+++)	(H); (-)
F1P3	(H); (-)	(H); (-)
F1P4	(H); (+++)	(H); (+)
F2P3	(H); (-)	(H); (-)
F2P4	(H); (+)	(H); (++)
F3P3	(H); (-)	(H); (+)
F3P4	(H); (+++)	(H); (++)
F4P3	(H); (+++)	(H); (+++)
F4P4	(H); (++++)	(H); (+++)
F5P3	(H); (+++)	(H); (+++)
F5P4	(H); (+++)	(H); (+++)

Görünüm değerlendirme: Homojen (H); Koalesans (K); Kısmi Faz ayrımı (KFA); Tam Faz ayrımı (TFA); Sedimentasyon miktarı yok (-), çok az (+), az (++) , orta (+++), fazla (++++), çok fazla (+++++)

4.2.3 Formülasyonların Fizikokimyasal Stabiliteler ve Karakterizasyonu

Piperin NE'lerinin stabilitelerini değerlendirmek amacıyla formülasyonlar hava geçirmez cam tüplerde gerçek saklama koşullarında (2-8°C) ve hızlandırılmış (25°C±2°C/% 60 ±% 5 relatif nem (R.N.)) ve iklimlendirme kabiniinde 40°C±2°C/% 75 ±% 5 R.N.) test koşullarında 3 ay süre ile bekletilerek yaşlandırma testleri yürütüldü.

Bu kapsamda, belirlenen zaman aralıklarında (0. gün, 1, 2, 3.ay) alınan örneklerle, pH, iletkenlik, viskozite, damlacık boyutu, zeta potansiyeli ve etkin madde içeriği gibi parametreler değerlendirildi. Formülasyonların termodinamik stabilitelerini değerlendirmek için ısıtma-soğutma testi ile belirgin sıcaklık farklılıklarına maruz bırakıldı. Test sonucunda organoleptik değerlendirmelerin yanı sıra damlacık boyutu, partikül büyüklüğü dağılımı (polidispersite indeksi, Pdl) ve zeta potansiyeli analiz edildi.

4.2.4 Isıtma-Soğutma Testi

Formülasyonların sıcaklık değişimlerine karşı dayanıklılığını saptamak amacıyla ısıtma-soğutma testi uygulandı. Isıtma-soğutma testinde formülasyonlar 6 siklus şeklinde buzdolabı (5°C) ve 45°C'de iklimlendirme kabiniinde tutuldu. Formülasyonlar her sıcaklık noktasında 48 saat bekletildi. Bu test sonucunda formülasyonlarda faz ayrımı, bulanıklaşma gibi herhangi bir bozulma olup olmadığı kontrol edildi.

Bu doğrultuda elde edilen ortalama damlacık çapı, polidispersite indeksi (Pdl) ve zeta potansiyeli verilerine ait tablolar aşağıdaki Çizelge 4. 8'de verildi.

Çizelge 4. 8 Formülasyonların 1. günde ve ısıtma-soğutma testinden sonra ölçülen ortalama damlacık çapı, Pdl ve zeta potansiyeli değerlerine ait bulgular

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		Pdl		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	I-S	1.gün	I-S	1.gün	I-S
F1P1	218,10	412,00	0,070	0,151	-29,6	-20,8
F1P2	212,20	370,30	0,098	0,164	-27,7	-37,6
F2P1	223,10	446,60	0,104	0,181	-29,7	-31,1

Çizelge 4. 8 Formülasyonların 1. günde ve ısıtma-soğutma testinden sonra ölçülen ortalama damlacık çapı, Pdl ve zeta potansiyeli değerlerine ait bulgular (devamı)

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		Pdl		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	I-S	1.gün	I-S	1.gün	I-S
F2P2	213,20	394,60	0,067	0,135	-28,1	-33,8
F3P1	213,90	505,90	0,077	0,124	-26,8	-34,7
F3P2	216,00	398,30	0,094	0,151	-27,5	-30,8
F1P3	203,30	480,40	0,182	0,099	-27,9	-36,4
F1P4	209,03	480,20	0,171	0,180	-28,6	-44,0
F2P3	208,96	470,00	0,211	0,087	-27,1	-32,1
F2P4	202,64	396,30	0,270	0,070	-26,5	-27,6
F3P3	208,88	525,50	0,087	0,075	-27,0	-32,2
F3P4	219,20	518,30	0,084	0,031	-28,0	-35,2

4.2.5 Yaşlandırma Testleri

Formülasyonların fizikokimyasal stabilitelerini değerlendirmek amacıyla yaşlandırma testleri yürütüldü. Hızlandırılmış stabilite testini geçen formülasyonlar yaşlandırma testlerine maruz bırakıldı. Hazırlanan formülasyonlar şeffaf cam tüplerde, 3 ay boyunca, gerçek saklama koşullarında 25°C±2, %60 R.N.'de; hızlandırılmış koşullarda etüvde 40°C±2, %75 R.N.'de ve buzdolabında 5°C±3'de bekletildi. 1. günde, 1. ay, 2. ay ve 3. ayda numunelerin pH, iletkenlik, renk, görünüm, kıvam, ortalama damlacık büyüklüğü, zeta potansiyeli, Pdl, viskozite ve etkin madde içeriği gibi özelliklerinde herhangi bir bozulma olup olmadığını saptamak amacıyla, organoleptik kontroller, ortalama damlacık büyüklüğü (Çizelge 4. 9), zeta potansiyeli (Çizelge 4. 10), Pdl (Çizelge 4.11), viskozite (Çizelge 4.12-4.23), pH (Çizelge 4. 24), iletkenlik (Çizelge 4. 25) ve etkin madde içeriği (Çizelge 4. 26) tayin edildi.

4.2.5.1 Organoleptik Kontroller

Formülasyonların organoleptik ve fiziksel kontrolleri (renk, koku, görünüm, sivilaşma, kremalaşma, faz ayrımı) belirlenen koşullarda ve zaman aralıklarında yapıldı. Kontroller sonucunda formülasyonların başlangıçta elde edilen fiziksel özelliklerinde değişim görölmediğinden, tüm formülasyonlar organoleptik açıdan stabil bulundu.

4.2.5.2 Zeta Potansiyeli ve Boyut Ölçümü

Ortalama damlacık büyüklüğünü, Pdl değerini ve zeta potansiyelini saptamak amacıyla, Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı (Şekil 4.4) ile foton korelasyon spektroskopisi esasına dayanarak, NE'lerin distile su ile uygun oranda seyreltilmesinden sonra (1:100), hazırlandıktan 24 saat içerisinde tayin edildi.



Şekil 4.4 Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı

Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen ortalama damlacık çapı, zeta potansiyeli ve Pdl değerleri Çizelge 4. 9-4. 11'de gösterilmektedir.

Çizelge 4. 9 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen ortalama damlacık çapı değerleri

Formülasyon	Ortalama Damlacık Çapı (nm)									
Kod	5°C±2			25°C±2				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1.gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P1	211,8	207,8	227,9	218,1	228,2	260,8	274,4	430,9	437,4	435,2
F1P2	212,5	209,5	222,9	212,2	221,3	237,5	279,7	422,8	434,0	453,2
F2P1	207,6	217,9	244,1	223,1	234,8	254,4	275,2	407,3	426,1	460,7
F2P2	263,1	241,6	233,9	213,2	224,5	273,8	260,0	436,7	508,2	541,4
F3P1	202,3	215,4	232,3	213,9	216,4	250,2	273,0	475,9	557,0	578,4
F3P2	198,3	202,6	226,9	216,0	221,5	274,6	264,6	487,0	553,7	600,9
F1P3	207,2	197,3	231,3	203,3	223,4	244,6	259,7	442,1	501,8	530,0
F1P4	184,7	198,2	218,2	209,03	216,1	248,0	256,9	422,1	446,7	530,5
F2P3	219,7	229,7	214,0	208,96	215,0	266,0	245,4	460,1	547,2	561,9
F2P4	217,1	221,7	216,2	202,64	219,3	244,4	285,1	421,9	510,7	552,8
F3P3	203,8	197,3	211,8	208,88	222,3	282,4	258,6	479	526,2	553,0
F3P4	224,9	217,9	227,0	219,2	217,6	246,2	261,1	452,9	519,2	624,2

Çizelge 4. 10 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen zeta potansiyeli değerleri

Formülasyon	Zeta Potansiyeli (mV)									
Kod	5°C±2			25°C±2				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1.gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P1	-30,5	-30,6	-29,6	-29,6	-29,7	-30,4	-29,9	-30,0	-30,8	-30,9
F1P2	-26,7	-26,4	-26,6	-27,7	-27,3	-28,7	-28,1	-30,4	-30,1	-30,4
F2P1	-30,5	-30,8	-30,1	-29,7	-29,0	-30,4	-29,3	-30,7	-31,1	-30,3
F2P2	-26,8	-27,6	-26,4	-28,1	-29,1	-29,6	-26,8	-30,4	-31,3	-31,5
F3P1	-26,4	-26,1	-25,2	-26,8	-25,1	-25,4	-25,6	-29,3	-29,7	-28,9
F3P2	-28,7	-28,6	-28,5	-27,5	-27,0	-28,0	-26,8	-30,5	-30,0	-31,1

Çizelge 4. 10 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen zeta potansiyeli değerleri (devamı)

Formülasyon	Zeta Potansiyeli (mV)									
Kod	5°C±2			25°C±2				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1.gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P3	-27,6	-28,2	-28,2	-27,9	-29,0	-30,6	-30,7	-32,0	-33,1	-30,3
F1P4	-26,3	-25,5	-25,7	-28,6	-28,0	-29,5	-29,4	-28,4	-28,0	-28,9
F2P3	-26,1	-26,8	-26,0	-27,1	-26,7	-27,4	-26,0	-28,8	-28,7	-30,5
F2P4	-26,2	-27,0	-27,7	-26,5	-25,5	-27,1	-25,2	-26,6	-28,2	-28,6
F3P3	-26,1	-26,8	-27,0	-27,0	-28,3	-30,1	-29,0	-29,7	-29,4	-26,4
F3P4	-26,8	-27,1	-26,1	-28,0	-26,4	-28,5	-25,9	-30,7	-28,9	-26,8

Çizelge 4. 11 Zetasizer Nano ZS cihazı ile elde edilen polidispersite indeksleri (PdI)

Formülasyon	PdI									
Kod	5°C±2			25°C±2				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1.gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P1	0,091	0,135	0,092	0,070	0,043	0,112	0,178	0,200	0,158	0,277
F1P2	0,158	0,109	0,061	0,098	0,041	0,065	0,084	0,093	0,107	0,025
F2P1	0,066	0,103	0,022	0,104	0,118	0,035	0,129	0,250	0,074	0,226
F2P2	0,208	0,221	0,137	0,067	0,070	0,214	0,104	0,227	0,024	0,006
F3P1	0,051	0,113	0,122	0,077	0,052	0,171	0,023	0,214	0,044	0,065
F3P2	0,055	0,025	0,161	0,094	0,030	0,220	0,035	0,203	0,122	0,262
F1P3	0,099	0,102	0,112	0,182	0,014	0,020	0,044	0,181	0,205	0,224
F1P4	0,006	0,068	0,021	0,171	0,082	0,153	0,115	0,185	0,014	0,079
F2P3	0,188	0,103	0,033	0,211	0,049	0,181	0,187	0,192	0,079	0,084
F2P4	0,197	0,008	0,140	0,270	0,020	0,154	0,247	0,058	0,026	0,200
F3P3	0,137	0,002	0,053	0,087	0,028	0,187	0,064	0,107	0,095	0,247
F3P4	0,093	0,021	0,050	0,084	0,065	0,155	0,078	0,207	0,014	0,136

4.2.5.3 Viskozite Tayini

Viskozite, stres koşullarının nanoemülsiyon stabilitesi üzerine etkisinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan önemli parametrelerden biridir. Ayrıca, ürünün ambalaj malzemesine dolumu, kullanım kolaylığı, fiziksel görünüşü, kıvamı ve cilde sürülebilirliği gibi kalite özellikleri ile ilgilidir. Bu bağlamda, formülasyonların viskozite ölçümleri 3 ay boyunca takip edildi. Ölçümler, belirlenen zaman aralıklarında oda sıcaklığında cone plate viskozimetre (Brookfield HA DV3T, spindle no: CP-40) kullanılarak alındı. Formülasyonların viskozite bulgularına ait veriler aşağıdaki Çizelge 4.12- 23'te yer almaktadır. Elde edilen viskozite verilerine göre F1P1 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 12 F1P1 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F1P1									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N.)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	6,63	6,58	6,54	6,61	6,58	6,54	6,61	6,56	6,52	6,38
75	6,60	6,58	6,54	6,61	6,53	6,58	6,63	6,55	6,52	6,37
80	6,62	6,60	6,52	6,62	6,55	6,55	6,60	6,54	6,50	6,38
85	6,62	6,61	6,56	6,60	6,54	6,54	6,62	6,54	6,51	6,36
90	6,61	6,60	5,55	6,60	6,52	6,52	6,62	6,56	6,52	6,32
95	6,61	6,59	5,54	6,63	6,51	6,52	6,63	6,56	6,50	6,32
100	6,64	6,58	5,54	5,64	6,52	6,50	6,63	6,54	6,50	6,31
105	6,68	6,58	5,55	5,64	6,53	6,54	6,60	6,52	6,50	6,33
110	6,68	6,56	5,54	5,65	6,54	6,53	6,61	6,52	6,51	6,36
115	6,63	6,56	5,54	5,61	6,53	6,54	6,60	6,52	6,50	6,34

Elde edilen viskozite verilerine göre F1P2 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 13 F1P2 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F1P2									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N.)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	6,82	7,10	6,91	6,89	6,80	6,54	6,56	6,78	6,80	6,61
75	6,80	7,11	6,89	6,88	6,82	6,52	6,58	6,80	6,78	6,63
80	6,83	6,98	6,90	6,89	6,80	6,51	6,54	6,80	6,78	6,62
85	6,80	6,99	6,90	6,87	6,82	6,52	6,54	6,77	6,76	6,61
90	6,80	6,98	6,88	6,88	6,79	6,54	6,54	6,78	6,76	6,62
95	6,79	6,96	6,91	6,84	6,80	6,52	6,58	6,78	6,74	6,63
100	6,81	6,96	6,90	6,86	6,78	6,56	6,54	6,78	6,76	6,6
105	6,78	6,98	6,91	6,86	6,76	6,54	6,58	6,76	6,78	6,61
110	6,77	6,94	6,89	6,85	6,76	6,54	6,54	6,76	6,74	6,61
115	6,82	6,96	6,91	6,83	6,76	6,52	6,54	6,74	6,78	6,61

Elde edilen viskozite verilerine göre F2P1 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 14 F2P1 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F2P1									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N.)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	6,38	6,45	6,42	6,47	6,32	6,29	6,34	6,22	6,24	6,19
75	6,34	6,45	6,40	6,45	6,36	6,31	6,36	6,21	6,26	6,21
80	6,36	6,46	6,38	6,44	6,35	6,26	6,32	6,22	6,26	6,21
85	6,36	6,48	6,39	6,46	6,34	6,27	6,32	6,18	6,25	6,20
90	6,34	6,48	6,38	6,48	6,36	6,28	6,37	6,20	6,24	6,19
95	6,36	6,46	6,41	6,44	6,35	6,30	6,36	6,20	6,24	6,16
100	6,36	6,45	6,38	6,46	6,38	6,26	6,34	6,18	6,21	6,17
105	6,34	6,45	6,38	6,46	6,35	6,26	6,34	6,22	6,22	6,16
110	6,34	6,44	6,40	6,45	6,34	6,22	6,35	6,20	6,26	6,11
115	6,32	6,45	6,38	6,44	6,36	6,29	6,34	6,21	6,24	6,14

Elde edilen viskozite verilerine göre F2P2 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 15 F2P2 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F2P2									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N.)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	6,02	5,98	5,92	5,82	6,00	5,89	5,90	5,84	5,80	5,82
75	6,04	5,96	5,90	5,79	5,99	5,84	5,92	5,84	5,79	5,83
80	6,04	5,94	5,91	5,82	5,98	5,86	5,90	5,86	5,81	5,81
85	6,03	5,96	5,89	5,80	5,94	5,88	5,92	5,85	5,81	5,82
90	6,02	5,95	5,85	5,81	5,95	5,88	5,89	5,83	5,78	5,80
95	6,00	5,96	5,86	5,83	5,96	5,83	5,90	5,84	5,80	5,79
100	6,02	5,97	5,84	5,80	5,95	5,85	5,90	5,82	5,81	5,79
105	6,02	5,96	5,84	5,79	5,95	5,81	5,92	5,82	5,77	5,80
110	6,01	5,95	5,85	5,78	5,97	5,83	5,91	5,84	5,78	5,82
115	6,03	5,96	5,87	5,79	5,94	5,85	5,92	5,82	5,77	5,80

Elde edilen viskozite verilerine göre F3P1 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 16 F3P1 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F3P1									
	25°C	5°C±2			25°C±2			40°C±2 (%75 R.N)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	6,82	6,78	6,66	6,75	6,80	6,74	6,78	6,65	6,58	6,59
75	6,85	6,76	6,62	6,74	6,78	6,72	6,77	6,64	6,59	6,57
80	6,85	6,78	6,61	6,78	6,79	6,72	6,75	6,65	6,60	6,57
85	6,83	6,74	6,62	6,78	6,79	6,75	6,74	6,63	6,60	6,59
90	6,84	6,76	6,62	6,76	6,81	6,74	6,78	6,63	6,59	6,60
95	6,85	6,77	6,63	6,75	6,83	6,74	6,78	6,63	6,60	6,61
100	6,82	6,74	6,61	6,75	6,81	6,73	6,76	6,64	6,59	6,62
105	6,84	6,76	6,60	6,78	6,80	6,72	6,76	6,62	6,58	6,60
110	6,83	6,78	6,58	6,74	6,83	6,70	6,75	6,62	6,58	6,60
115	6,83	6,78	6,57	6,75	6,82	6,70	6,76	6,60	6,57	6,61

Elde edilen viskozite verilerine göre F3P2 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 17 F3P2 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F3P2									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N.)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	7,01	7,13	7,02	6,96	7,11	7,01	7,00	6,89	6,85	6,76
75	7,03	7,13	7,02	6,99	7,09	7,01	7,01	6,93	6,86	6,77
80	7,03	7,11	7,02	7,01	7,08	7,02	7,00	6,93	6,88	6,75
85	7,01	7,12	7,00	7,03	7,10	7,01	6,98	6,92	6,89	6,74
90	7,05	7,12	6,98	7,00	7,10	7,00	6,96	6,91	6,88	6,76
95	7,03	7,11	6,99	7,01	7,09	7,01	6,99	6,90	6,86	6,74
100	7,02	7,11	6,98	6,98	7,09	7,03	6,98	6,91	6,89	6,74
105	6,98	7,10	7,01	6,98	7,11	7,02	6,98	6,90	6,88	6,70
110	6,98	7,08	7,02	6,98	7,08	7,03	6,99	6,88	6,88	6,72
115	7,02	7,07	7,02	6,98	7,09	7,03	6,97	6,89	6,89	6,73

Elde edilen viskozite verilerine göre F1P3 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 18 F1P3 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F1P3									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	6,95	7,04	6,99	7,04	6,93	6,98	6,92	6,85	6,86	6,83
75	6,98	7,04	6,96	7,03	6,93	6,95	6,91	6,86	6,89	6,84
80	6,96	7,01	6,96	7,04	6,94	6,96	6,88	6,88	6,88	6,81
85	6,96	7,03	6,95	7,04	6,94	6,96	6,89	6,89	6,88	6,80
90	6,95	7,04	6,96	7,00	6,94	6,97	6,90	6,84	6,86	6,78
95	6,94	6,98	6,92	7,03	6,95	6,93	6,90	6,83	6,89	6,78
100	6,94	6,96	6,93	7,01	6,94	6,91	6,90	6,83	6,86	6,80
105	6,95	6,98	6,93	7,00	6,92	6,93	6,89	6,84	6,84	6,81
110	6,94	6,98	6,93	7,01	6,92	6,93	6,89	6,84	6,86	6,83
115	6,95	6,97	6,95	7,01	6,91	6,94	6,91	6,81	6,84	6,83

Elde edilen viskozite verilerine göre F1P4 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 19 F1P4 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F1P4									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	7,19	7,22	7,11	7,15	7,15	7,18	7,10	7,05	7,01	7,10
75	7,19	7,21	7,10	7,14	7,12	7,18	7,09	7,02	6,96	7,12
80	7,20	7,21	7,11	7,16	7,14	7,14	7,09	7,00	6,98	7,08
85	7,21	7,22	7,11	7,18	7,16	7,12	7,10	7,03	7,03	7,08
90	7,20	7,20	7,09	7,18	7,14	7,12	7,12	6,96	7,00	7,06
95	7,18	7,19	7,09	7,16	7,14	7,14	7,16	6,98	6,98	7,08
100	7,18	7,19	7,10	7,14	7,15	7,16	7,14	7,00	6,98	7,10
105	7,16	7,16	7,10	7,16	7,16	7,14	7,08	6,98	7,00	7,11
110	7,16	7,14	7,10	7,14	7,16	7,16	7,12	6,96	7,02	7,01
115	7,18	7,14	7,06	7,12	7,14	7,14	7,14	6,98	7,02	7,03

Elde edilen viskozite verilerine göre F2P3 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 20 F2P3 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F2P3									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	5,85	5,89	5,97	5,95	5,90	5,86	5,93	6,02	5,97	5,92
75	5,86	5,89	5,96	5,95	5,85	5,88	5,88	6,01	5,97	5,88
80	5,84	5,88	5,96	5,91	5,84	5,89	5,89	6,01	5,92	5,84
85	5,84	5,88	5,97	5,92	5,84	5,84	5,89	6,02	5,95	5,88
90	5,88	5,59	5,93	5,90	5,86	5,84	5,92	6,01	5,93	5,86
95	5,86	5,85	5,95	5,92	5,85	5,88	5,92	5,98	5,95	5,86
100	5,82	5,86	5,96	5,88	5,86	5,89	5,90	5,96	5,96	5,84
105	5,84	5,86	5,95	5,86	5,86	5,93	5,92	5,98	5,94	5,83
110	5,84	5,83	5,94	5,88	5,83	5,92	5,88	5,96	5,94	5,85
115	8,82	5,81	5,95	5,88	5,85	5,90	5,89	5,94	5,94	5,83

Elde edilen viskozite verilerine göre F2P4 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 21 F2P4 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F2P4									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	5,98	5,86	5,89	5,72	5,85	5,89	5,83	5,84	5,79	5,78
75	5,96	5,84	5,89	5,76	5,86	5,88	5,81	5,84	5,74	5,82
80	5,97	5,84	5,92	5,74	5,84	5,88	5,80	5,81	5,76	5,80
85	5,96	5,88	5,90	5,74	5,84	5,92	5,80	5,80	5,76	5,82
90	5,93	5,86	5,92	5,73	5,82	5,93	5,83	5,82	5,78	5,82
95	5,96	5,85	5,93	5,74	5,82	5,92	5,81	5,82	5,78	5,80
100	5,93	5,83	5,96	5,74	5,83	5,90	5,80	5,86	5,72	5,83
105	5,93	5,83	5,90	5,76	5,81	5,89	5,78	5,82	5,74	5,80
110	5,96	5,82	5,91	5,76	5,84	5,84	5,82	5,88	5,76	5,81
115	5,94	5,86	5,90	5,73	5,85	5,86	5,80	5,86	5,78	5,81

Elde edilen viskozite verilerine göre F3P3 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 22 F3P3 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F3P3									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N.)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	5,59	5,52	5,42	5,42	5,58	5,56	5,62	5,59	5,70	5,58
75	5,58	5,50	5,39	5,40	5,58	5,49	5,64	5,58	5,68	5,60
80	5,62	5,49	5,38	5,37	5,56	5,52	5,60	5,59	5,69	5,62
85	5,62	5,49	5,41	5,38	5,62	5,52	5,57	5,56	5,70	5,63
90	5,62	5,53	5,41	5,40	5,59	5,54	5,57	5,54	5,71	5,62
95	5,60	5,52	5,42	5,38	5,59	5,56	5,60	5,59	5,72	5,62
100	5,58	5,52	5,40	5,38	5,60	5,56	5,59	5,58	5,71	5,63
105	5,59	5,48	5,40	5,41	5,61	5,54	5,60	5,55	5,71	5,59
110	5,59	5,49	5,38	5,40	5,63	5,53	5,60	5,55	5,72	5,59
115	5,61	5,48	5,38	5,40	5,63	5,54	5,62	5,52	5,72	5,56

Elde edilen viskozite verilerine göre F3P4 kodlu formülasyon; NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteye sahiptir, Newtonian tipi akış göstermektedir ve tüm stabilite koşullarında, formülasyonun viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır.

Çizelge 4. 23 F3P4 kodlu formülasyonun 3 aylık viskozite ölçümlerine ait bulgular

Hız (rpm)	F3P4									
	25°C	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)			40°C±2 (%75 R.N.)		
	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
70	7,19	7,10	7,14	7,05	7,08	7,06	6,95	6,98	6,93	6,79
75	7,18	7,09	7,16	7,06	7,08	7,04	6,95	6,99	6,94	6,80
80	7,16	7,13	7,14	7,04	7,10	7,01	6,93	7,01	9,91	6,81
85	7,17	7,13	7,14	7,01	7,09	7,02	6,94	7,02	6,92	6,78
90	7,17	7,11	7,10	7,03	7,10	7,01	6,92	7,01	6,90	6,78
95	7,15	7,10	7,11	7,01	7,10	7,00	6,93	6,99	6,89	6,79
100	7,16	7,11	7,13	7,01	7,07	6,98	6,95	6,98	6,91	6,81
105	7,16	7,12	7,12	7,00	7,09	6,96	6,94	6,98	6,90	6,83
110	7,16	7,09	7,12	7,02	7,08	6,98	6,93	6,98	6,90	6,81
115	7,15	7,10	7,10	7,01	7,08	6,98	6,95	6,99	6,91	6,80

4.2.5.4 pH ve İletkenlik Ölçümü

Formülasyonların pH ve iletkenlik ölçümleri, oda sıcaklığında (25±2°C ve %65 R.N.), buzdolabında (5±3°C) ve iklimlendime kabinde (40±2°C ve %75 R.N.) bekletilen formülasyonlarda, belirlenen koşullarda ve zaman aralıklarında alındı. Formülasyonların pH ve iletkenlik değerlerine ait bulgular sırasıyla Çizelge 4. 24 ve Çizelge 4. 25'te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 24 pH-metre cihazı ile elde edilen pH ölçüm sonuçları

Formülasyon	pH									
Kod	5°C±3			25°C±2 (%65 R.N.)				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1.gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P1	7,32	7,29	7,49	7,36	7,34	7,28	7,21	7,35	7,23	6,94
F1P2	7,56	7,48	7,57	7,50	7,58	7,42	7,42	7,55	7,59	6,58
F2P1	7,15	7,15	7,12	7,48	7,75	7,73	7,61	7,75	7,74	7,17
F2P2	7,81	7,76	7,67	7,85	7,83	8,75	8,50	7,99	7,78	7,19
F3P1	7,28	7,22	7,38	7,19	7,22	7,12	7,14	7,12	7,14	6,80
F3P2	8,76	8,71	8,11	8,58	8,55	8,58	8,46	8,96	8,86	8,53
F1P3	7,28	7,34	7,31	7,27	7,30	7,34	7,28	7,33	7,19	6,83
F1P4	7,28	7,23	7,27	7,31	7,30	7,23	7,27	7,26	7,16	6,83
F2P3	7,17	7,14	7,18	7,21	7,26	7,24	7,16	7,18	7,23	6,85
F2P4	7,23	7,33	7,36	7,26	7,31	7,33	7,20	7,24	7,17	6,88
F3P3	7,16	7,17	6,93	7,25	7,28	7,17	6,95	7,50	7,24	7,00
F3P4	7,28	7,23	7,24	7,27	7,30	7,23	7,02	7,36	7,33	7,22

Çizelge 4. 25 Formülasyonların iletkenlik değerleri

Formülasyon	İletkenlik (µs/cm)									
Kod	5°C±3			25°C±2 (%65 R.N.)				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1.gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P1	55,7	55,2	56,6	49,17	55,1	56,4	53,6	56,3	58,4	59,0
F1P2	56,4	52,1	58,6	50,7	56,2	60,4	56,7	55,5	58,1	109,4
F2P1	53,5	48,6	52,9	50,2	50,8	52,3	100,6	90,1	101,4	101,5
F2P2	53,4	54	53,3	50,5	50,6	50,8	51,4	53,1	51,1	53,1
F3P1	52,5	53,1	51,6	50,1	52,0	52,3	55,3	52,6	53,3	54,0
F3P2	50,5	51,8	85,7	44,8	43,0	49,4	84,4	46,2	45,2	102,1
F1P3	52,8	56,7	52,4	50,1	57,6	55,3	58,3	56,5	56,8	58,1
F1P4	53,6	50,4	55	50,2	52,8	57,8	52,8	56,4	55,8	59,7
F2P3	52,6	52,3	54,3	50,2	56,7	58,3	57,2	58,8	58,5	60,6
F2P4	52,5	62,8	55,6	49,6	57,4	55,8	54,9	57,6	58,2	59,4
F3P3	53,9	55,1	82,6	48,8	55,7	68,4	58,7	63,1	66,3	61,6
F3P4	54,8	54,2	55,6	50,2	56,3	54,6	52,4	57,5	61,1	62,8

4.2.5.5 Etkin Madde İçerik Tayini

Etkin madde içeriklerinin saptanması amacıyla 15 mg, 30 mg ve 150 mg piperin içeren formülasyonlardan (0,5 mg/ml piperin) sırasıyla 0,4 g, 0,2 g ve 0,04 g formülasyon 10 ml'lik balon jojeye alınarak metanol ile hacmine tamamlandı (6 µg/ml piperin). Ardından, 30 dakika ultrasonik banyoda karıştırılarak çözündürüldü (Şekil 4. 5).



Şekil 4.5 Etkin madde tayini için ultrasonik banyoda karıştırılan numuneler

Hazırlanan numunelerin absorbansları, 343,4 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçüldü. Absorbanslar önceden hazırlanmış kalibrasyon eğrisi denkleminde yerleştirilerek etkin madde miktar tayinleri yapıldı. Etkin madde stabilite ölçümleri sonucu elde edilen değerler Çizelge 4. 26’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26 Formülasyonların 5°C, 25°C ve 40°C’deki etkin madde stabilitelerine ait bulgular

	Etkin madde içeriği (%) (n=3)									
Kod	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P1	91,74	87,44	84,21	100	93,49	84,61	80,58	86,76	85,69	84,75
F1P2	93,62	92,55	78,88	100	98,47	94,84	88,78	93,09	92,41	90,13
F2P1	89,05	78,42	77,08	100	100,08	88,38	82,86	91,34	88,65	83,00
F2P2	97,66	92,28	88,11	100	96,18	92,82	89,05	87,84	83,53	81,11
F3P1	95,10	92,01	77,75	100	101,83	100,48	91,87	99,68	79,36	76,14
F3P2	94,97	85,96	75,87	100	101,02	101,43	98,74	100,75	78,56	76,14

Çizelge 4.26 Formülasyonların 5°C, 25°C ve 40°C'deki etkin madde stabilitelerine ait bulgular (devamı)

Kod	Etkin madde içeriği (%) (n=3)									
	5°C±2			25°C±2 (%65 R.N.)				40°C±2 (%75 R.N.)		
	1.ay	2.ay	3.ay	1. gün	1.ay	2.ay	3.ay	1.ay	2.ay	3.ay
F1P3	89,19	87,03	79,50	100	93,76	82,73	79,50	89,32	86,49	75,46
F1P4	88,92	85,55	83,80	100	96,45	86,22	83,80	93,76	85,69	77,75
F2P3	86,63	85,02	78,42	100	85,55	84,61	81,92	90,39	83,53	77,48
F2P4	99,14	93,49	79,63	100	98,47	89,86	81,92	85,69	79,23	67,39
F3P3	89,59	88,11	76,81	100	95,51	92,82	75,73	97,26	89,45	74,79
F3P4	98,60	92,28	83,13	100	101,02	96,72	85,55	101,96	91,47	85,55

4.3 Piperinin Çözünürlük Tayini

Piperinin *in vitro* salım çalışmalarında sink koşulu sağlayacak en uygun miktarda çözündüğü salım ortamını saptamak amacıyla çeşitli çözücü ortamları kullanılarak 37°C'de piperinin çözünürlüğü tayin edildi. Bu amaçla kullanılan salım ortamları şunlardır:

1. pH 7,4 Fosfat tamponu solüsyonu (PBS)
2. pH 7,4 PBS+ etanol (80:20 h/h)
3. pH 7,4 PBS + etanol (70:30 h/h)
4. pH 7,4 PBS+ tween 20 (%0,25)
5. pH 7,4 PBS+ tween 20 (%0,5)
6. pH 7,4 PBS+ tween 20 (%0,5) + etanol (20)

Çalışma için 30 mg piperin herbir salım ortamı için hassas tartıldı. Kapaklı bir erlene konuldu ve üzerine 10 ml salım ortamı eklendi. Ardından 37°C’de 200 devir/dakika hızda 24 saat boyunca çalkalanarak bekletildi. 24 saatin sonunda örnek çalkalayıcıdan alındı ve süzüldü. Süzüntüden 1 ml alındı ve 10 ml’ye metanol ile seyreltildi. Ardından UV ile miktar tayini yapıldı. Doğru denklemi yardımıyla çözünen piperin miktarı hesaplandı. Deney 3 defa tekrarlanarak ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı (Çizelge 4. 27).

Çizelge 4. 27 Piperinin belirli çözünme ortamlarındaki çözünürlüklerine ait veriler (n=3)

Çözünme Ortamı	Doygunluk Konsantrasyonu (µg/mL)
pH 7,4 Fosfat tamponu solüsyonu (PBS)	15,819±0,006
pH 7,4 PBS+ tween 20 (%0,25)	54,641±0,014
pH 7,4 PBS+ tween 20 (%0,5)	84,073±0,101
pH 7,4 PBS+ etanol (80:20 h/h)	128,545±0,050
pH 7,4 PBS + etanol (70:30 h/h)	298,117±0,059
pH 7,4 PBS+ tween 20 (%0,5) + etanol (20)	211,945±0,209

Piperinin *in vitro* salım çalışmasında reseptör faz ortamı olarak kullanılacak ve sink koşulları sağlayan ortamı belirlemek amacıyla yürütülen çözünürlük çalışmasında çözünürlüğün yeterli olduğu ortamın 15,819±0,006 µg/ml ile pH 7,4 Fosfat tamponu olduğu saptanmıştır.

4.4 *In vitro* Salım Çalışması

Piperin içeren nanoemülsiyonların *in vitro* salım profilleri diyaliz yöntemi ile incelendi. Diyaliz membran tüp (avg flat width 25 mm, m.wt. cut-off: 12,000–14,000) kullanılmadan önce pH 7,4 fosfat tamponu salım ortamı içerisinde 1 gece buzdolabında bekletildi.

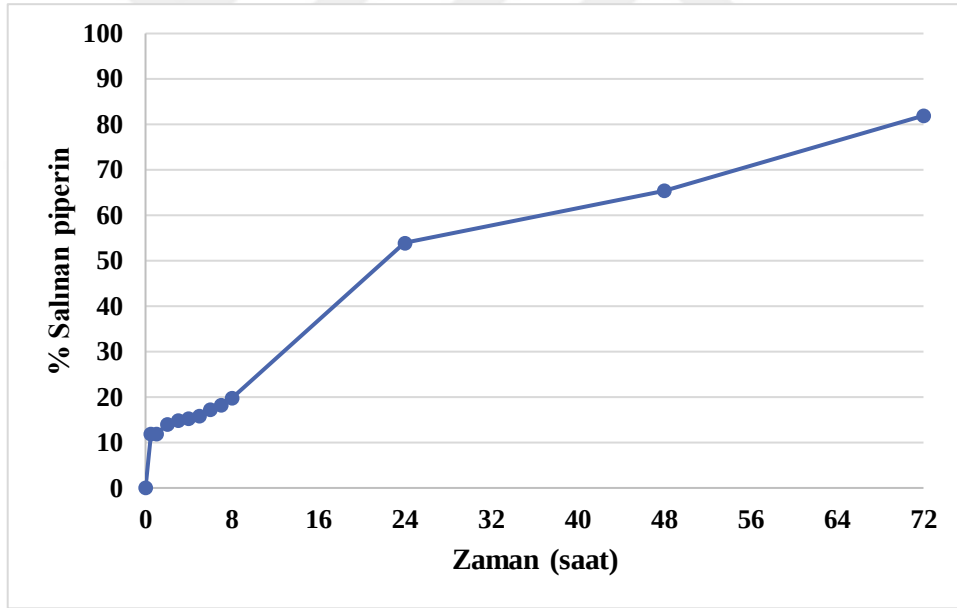
Ertesi gün 400 ml'lik 4 beher içerisine 200 ml salım ortamı konuldu ve su banyosu üzerinde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'ye gelmesi bekledi. Bu sırada sink koşulları sağlayacak şekilde 3 diyaliz kapsülünün herbirine 2 g formülasyon (1,5 mg/g piperin içeren) yerleştirildi. Salım ortamları istenen sıcaklığa geldiğinde diyaliz kapsüller beher içerisine daldırıldı ve karıştırma hızı 100 rpm hıza ayarlanarak bir manyetik bar yardımıyla karıştırıldı. 30. dakika, 1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 24., 48. ve 72. saatlerde salım ortamlarından 1'er ml numune alınarak her biri 10 ml'lik balon jojelere konuldu ve metanol ile hacmine tamamlandı. Alınan salım ortamlarının yerine beherlere aynı miktarda $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de taze salım ortamı ilave edildi. Örneklerin absorbanları, 343,4 nm dalga boyunda UV spektrofotometre ile okundu. Standart eğri yardımıyla açığa çıkan piperin miktarı hesaplandı (Çizelge 4. 28) ve zamana karşı % açığa çıkan madde miktarı grafiğe geçirildi (Şekil 4.6).

Çizelge 4. 28 Piperin içeren F3P2 kodlu formülasyona ait salım verileri

Zaman (saat)	Salım miktarı ($\mu\text{g/ml}$)	% Salım miktarı
0	0	0
1/2	355,125	11,84
1	355,125	11,84
2	419,693	13,99
3	443,906	14,80
4	460,048	15,33
5	476,190	15,87

Çizelge 4. 28 Piperin içeren F3P2 kodlu formülasyona ait salım verileri (devamı)

Zaman (saat)	Salım miktarı (µg/ml)	% Salım miktarı
6	516,546	17,22
7	548,830	18,29
8	593,220	19,77
24	1618,241	53,94
48	1961,259	65,38
72	2457,627	81,92



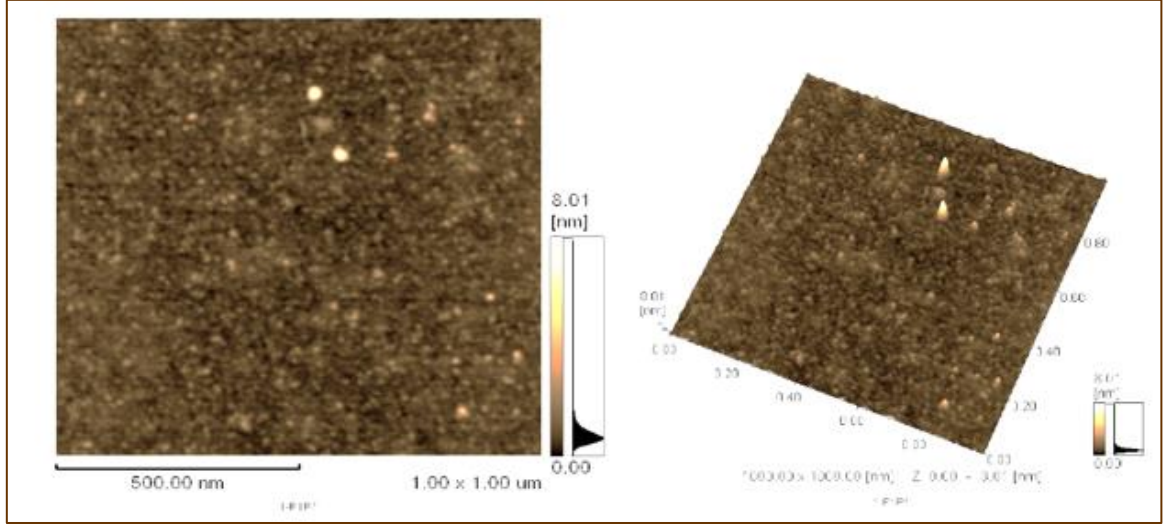
Şekil 4.6 Piperin içeren F3P2 kodlu formülasyona ait salım grafiği (n=3)

4.5 AFM Analizi

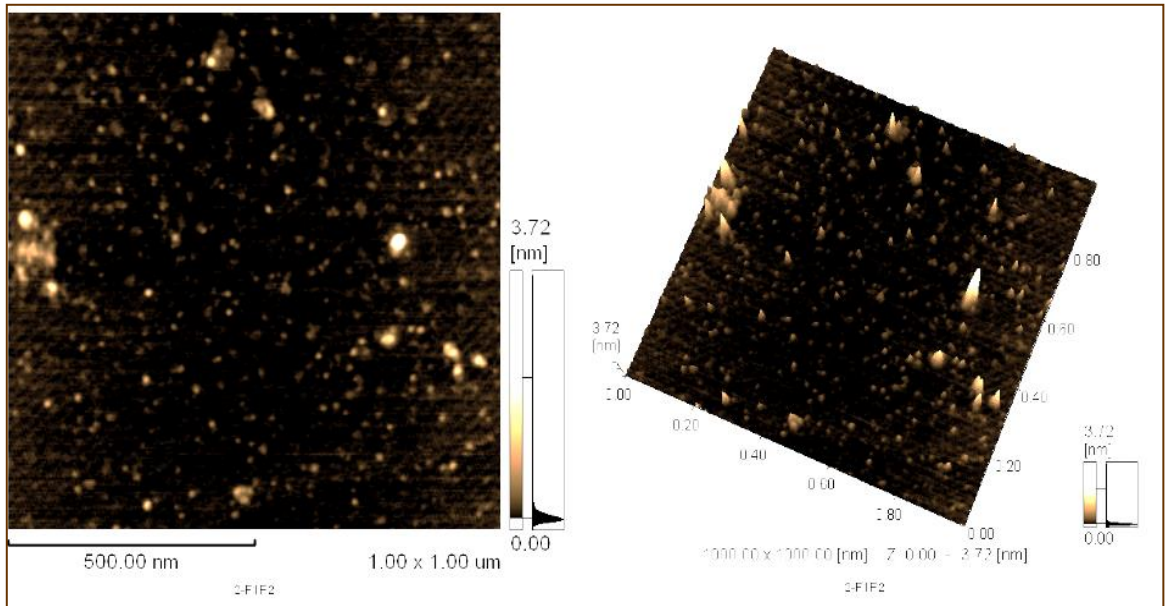
AFM ile piperin içeren NE'lerin boyut ve yüzey analizleri yapıldı. AFM cihazının prob yüzeyine önce 20 µl saf su damlatıldı ve 10 sn sonrasında su uzaklaştırıldı.

Ölçüm için farklı üretim prosedürleri ile elde edilen NE'lerin distile su ile uygun oranda (1:100) seyreltilmesinden sonra, örneklerden 5 µl alınarak prob yüzeyine immobilize edildi. 5 dakika bekletildikten sonra örnek sıvısı uzaklaştırıldı.

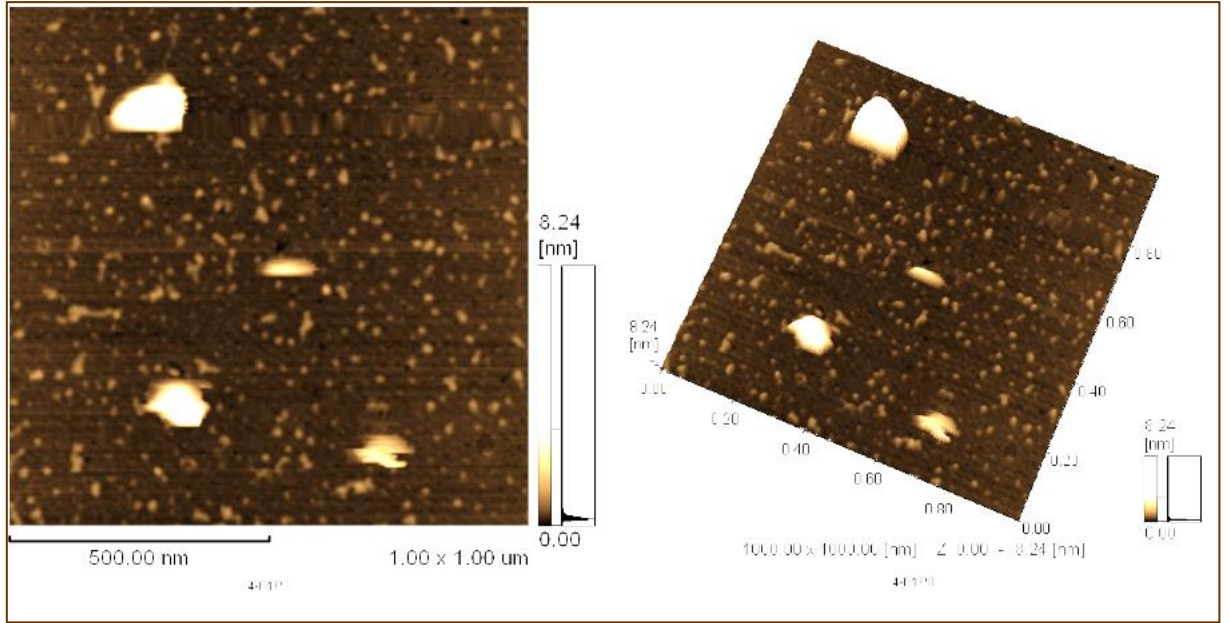
10 µl su ile prob yüzeyi yeniden yıkandı ve 30 dakika kuruması beklendikten sonra örnekler AFM cihazında analiz edildi. Ölçümler 1.00×1.00 µm yüzey aralığında yapıldı. Analiz sonucunda NE'lerin 2D ve 3D görüntüleri elde edildi (Şekil 4. 7-4. 10).



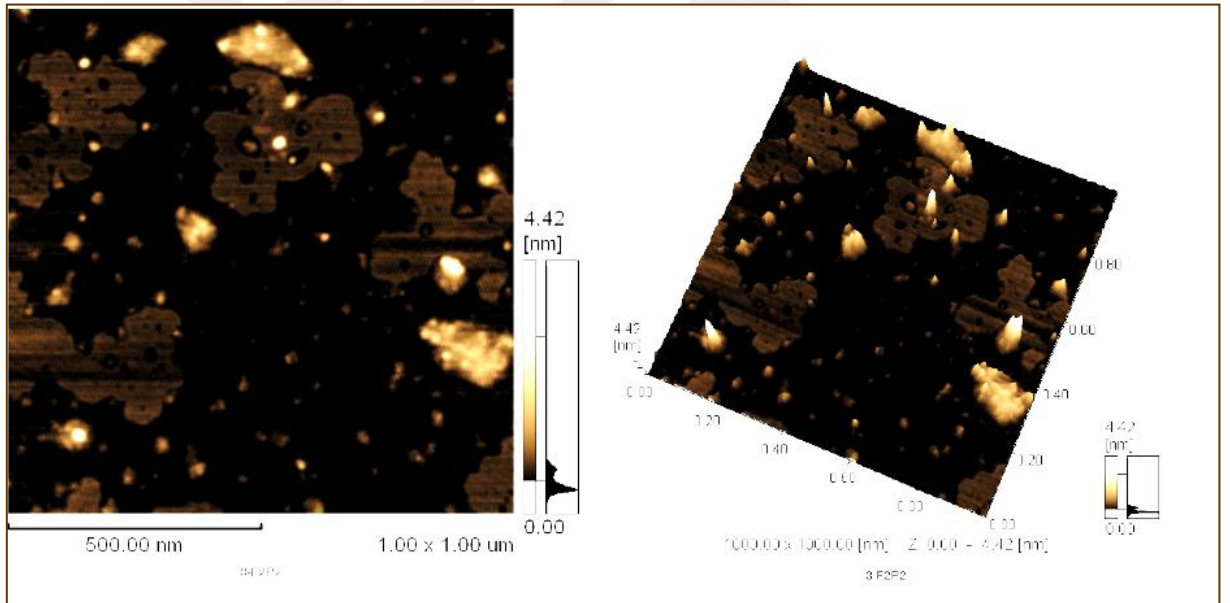
Şekil 4. 7 F1P1 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 µm) AFM görüntüsü



Şekil 4. 8 F1P2 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 µm) AFM görüntüsü



Şekil 4. 9 F1P3 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 μm) AFM görüntüsü

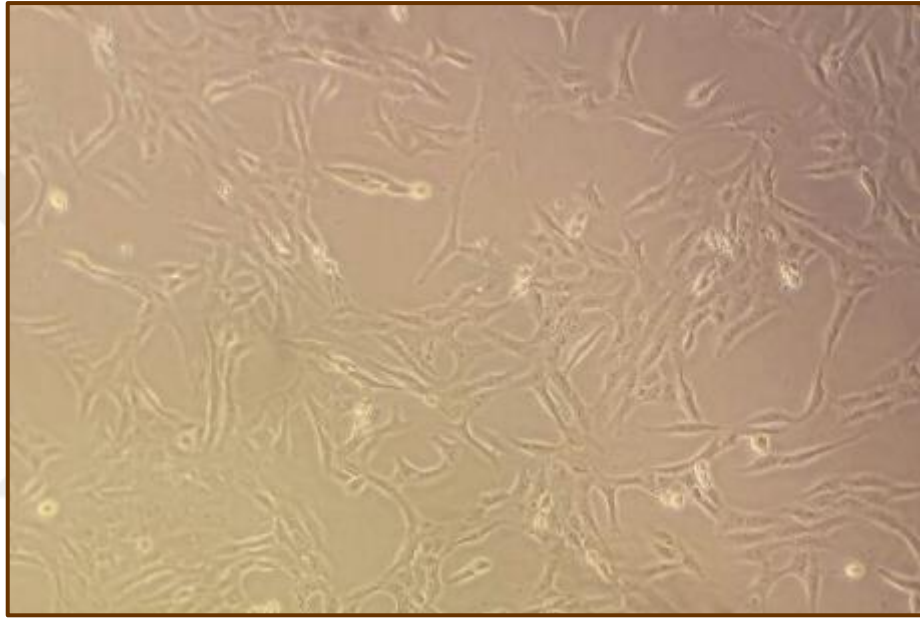


Şekil 4. 10 F2P2 kodlu formülasyonun 2D ve 3D (1.00×1.00 μm) AFM görüntüsü

4.6 Oluşturulan Nanoemülsiyonların L929 Fibroblast Hücreleri Üzerinde Toksik Etkisinin MTT Yöntemi ile İncelenmesi

Oluşturulan nanoemülsiyonların L929 Fare fibroblast hücreleri (Şekil 4.11) üzerindeki toksik etkisi MTT yöntemi ile gerçekleştirildi. Kültürde konfluent hale gelmiş sağlıklı L929 hücrelerinin besi-yeri dökülerek pasajlaması yapıldı.

Kısaca; hücreler PBS ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA eklendi ve tripsin aktivitesi için inkübasyon için etüve konularak 5 dakika bekletildi. Mikroskopla kontrol edildikten sonra flask yüzeyinden ayrıldığı görülen hücreler 5 ml %10 Fetal dana serumu (FBS) içeren DMEM-F12 besi-yeri içerisinde santrifüj tüpüne aktarıldı. 5 dakika 1000 rpm’de santrifüj edilip, süpernatant döküldü ve dipte kalan pellet homojenize edildi. Hücre sayımı için 2 µlt hücre alındı ve 48 µlt tripan blue ile karıştırıldı. Toma lamı üzerinde sayım yapıldı. Hücre sayımı yapıldıktan sonra hücre sayısı 10^4 /kuyucuk olacak şekilde MTT testinde kullanılmak üzere 96 kuyucuklu platelere aktarıldı.

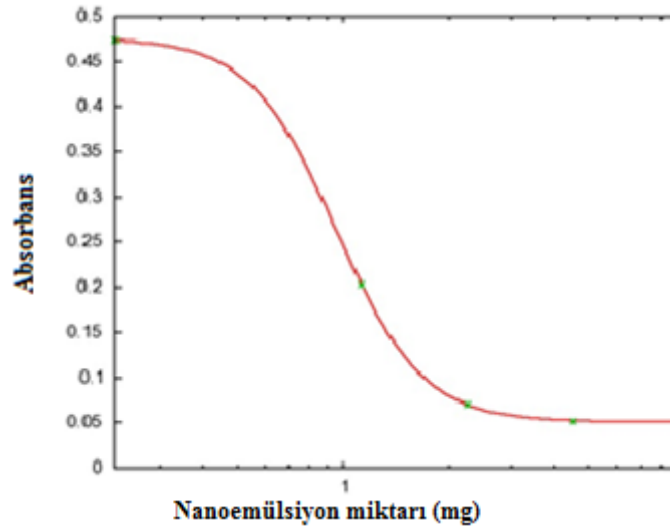


Şekil 4. 11 Kültürde çoğalan L929 hücrelerinin görünümü (x20)

37 °C de %5’lik karbondioksitli etüvde 24 saat inkübasyonun ardından 1, 5, 10, 20, ve 40 µl miktarında F1P1, F2P1, F3P1, F1P3, F2P3 ve F3P3 kodlu nanoemülsiyonlar her konsantrasyondan en az 5 kuyucuk olacak şekilde kuyucuklara eklendi.

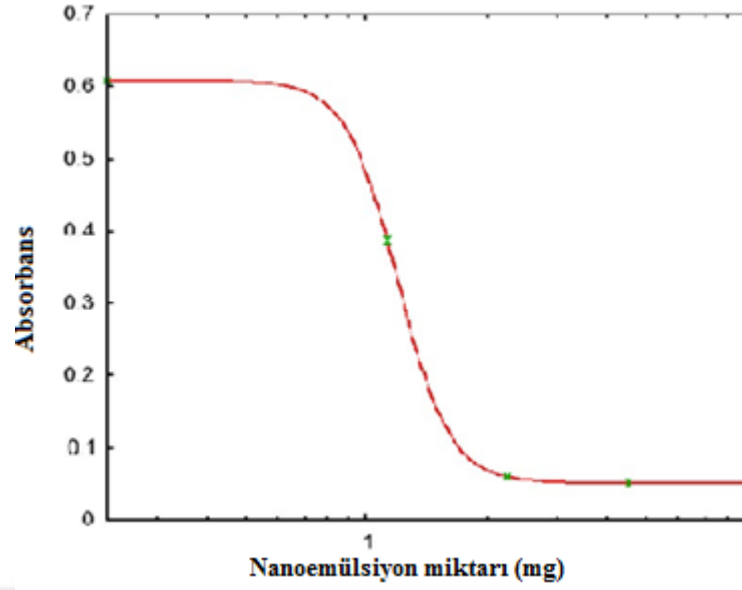
Formülasyonlar eklendikten sonra hücreler 24 saat 37°C’de %5’lik karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyon süreci sonucunda metabolik aktiviteyi ölçme amacıyla 3-[4,5- dimethylthiazol- 2-yl]-3,5-diphenyl tetrazolium bromid (MTT) çözeltisinden platelerin her bir kuyucuğuna 10 µl MTT boyası konuldu. 4 saat 37°C’de %5’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklardaki besiyeri çekilerek 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve formazan kristalleri çözündürüldü. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

570 nm dalga boyunda mikropate okuyuculu spektroskopide ölçümleri yapıldı. Oluşturulan nanoemülsiyonların L929 Fare fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etkisi IC_{50} değeri hesaplanarak incelenmiştir. IC_{50} ; bir maddenin sistemde, metabolizmada %50 inhibisyona neden olan konsantrasyonudur. IC_{50} ; inkübasyon süresi, konsantrasyon gibi deneysel sistemin bileşenlerine bağlıdır [208]. F1P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği şekil 4. 12’de gösterilmektedir. Grafikte görüldüğü gibi incelenen düşük dozlarda nanoemülsiyonların toksik etkisi bulunmazken, konsantrasyonu arttırıldığında hücre çoğalmasını inhibe etmiş ve toksik etkiler gösterilmiştir. Hesaplanan IC_{50} değeri 9,55009 mg/ml olup, bu miktarda nanoemülsiyon kullanıldığında L929 hücrelerinin yarısının inhibe olduğunu göstermektedir.



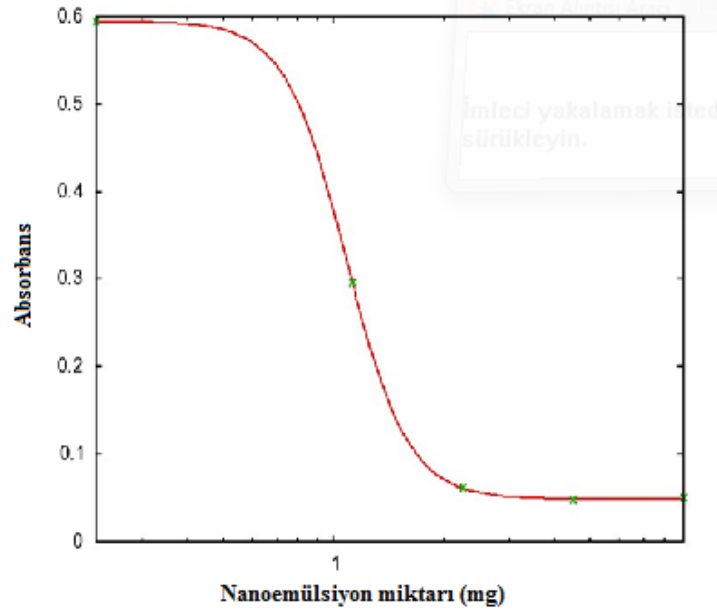
Şekil 4. 12 F1P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği

F1P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği şekil 4. 13’te gösterilmektedir. Grafikte görüldüğü gibi incelenen düşük dozlarda nanoemülsiyonların toksik etkisi bulunmamış ve hesaplanan IC_{50} değeri 11,9685 mg/ml olduğu tespit edilmiştir.



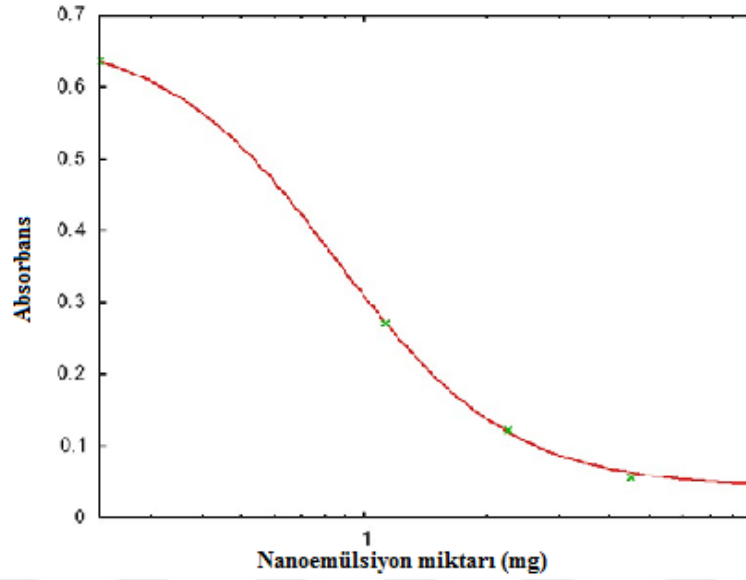
Şekil 4. 13 F1P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği

F2P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği Şekil 4. 14'de gösterilmektedir. Hesaplanan IC_{50} değeri 10,8407 mg/ml olup, bu miktarda nanoemülsiyon kullanıldığında L929 hücrelerinin yarısının inhibe olduğunu göstermektedir.



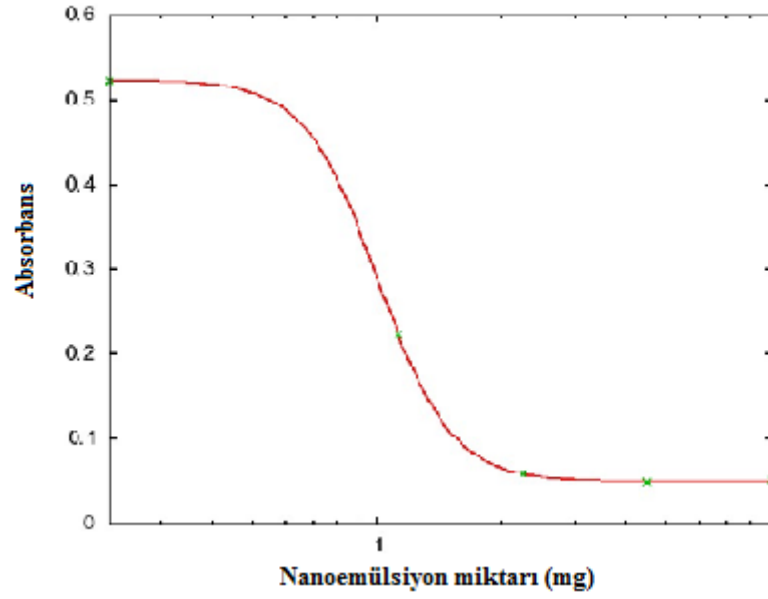
Şekil 4. 14 F2P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği

F2P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği şekil 4. 15’de gösterilmektedir. Grafikte görüldüğü gibi konsantrasyon arttırıldığında hücre çoğalmasını inhibe etmiştir. Hesaplanan IC_{50} değeri 8,55293 mg/ml olup, bu miktarda nanoemülsiyon kullanıldığında L929 hücrelerinin yarısının inhibe olduğunu göstermektedir.



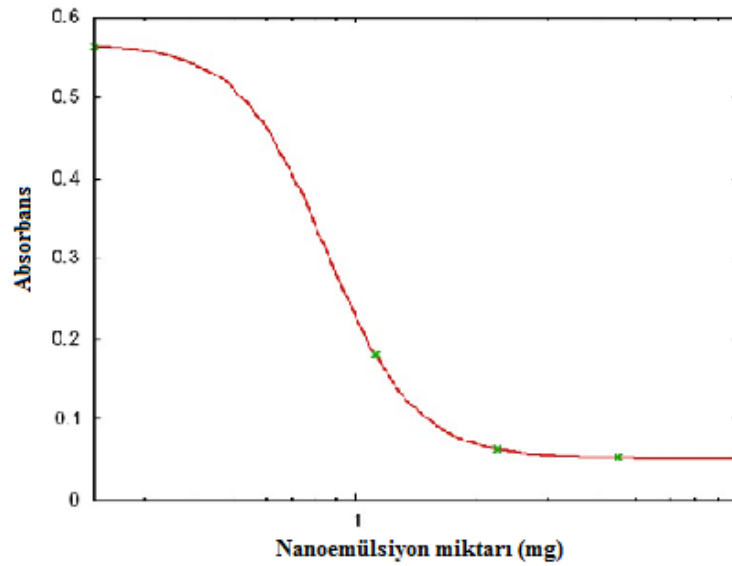
Şekil 4. 15 F2P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği

F3P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği şekil 4. 16’da gösterilmektedir. Hesaplanan IC_{50} değeri 10,0632 mg/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 4. 16 F3P1 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği

F3P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği Şekil 4. 17’de gösterilmektedir. Hesaplanan IC_{50} değeri 8,4772 mg/ml’dir.



Şekil 4. 17 F3P3 kodlu nanoemülsiyonun L929 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren MTT grafiği

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, piperin içeren hipopigmentasyon rahatsızlıklarında kullanılması amaçlanan topikal NE formülasyonları hazırlandı. Bu kapsamda, öncelikle piperinin formülasyonlardaki miktarının tayini için UV spektrofotometrede yöntem belirlendi ve bu yöntemin analitik validasyon çalışmaları yapıldı. Daha sonra, formülasyon bileşiminde yer alan maddeler ve bu maddelerin konsantrasyonları belirlendi ve üretim yöntemi olan ultrasonikasyon prosesinin parametreleri optimize edildi. Piperin NE'leri, 15 mg, 30 mg, 150 mg, 300 mg ve 600 mg içerecek şekilde hazırlandı. Sonrasında, formülasyonlara hızlandırılmış stabilite testleri olan santrifüj ve termal testler uygulanarak, kinetik ve termodinamik stabilite açısından ön bir değerlendirme yapıldı. Bu testler sonucunda stabil kalan formülasyonlar seçildi ve fizikokimyasal stabilite testlerine tabi tutuldu. 3 ay boyunca, 3 farklı koşulda (oda sıcaklığında, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %65 R.N., buzdolabında, $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve iklimlendirme kabininde, $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %75 R.N.) bekletilen formülasyonlarda belirlenen zaman aralıklarında (1. gün, 1. ay, 2. ay, 3. ay) pH, iletkenlik, viskozite, ortalama damlacık boyutu, Pdl değerleri, zeta potansiyeli ve etkin madde içerik analizleri yapıldı.

Hızlandırılmış stabilite testleri sonrasında, %7,5 (a/a) yağ fazı ve %15 (a/a) Smix (Pluronic® F68+Transcutol® HP) içeren formülasyonlarda koalesans, kremalaşma ve faz ayrımı gibi kolloidal sistemlerde sıklıkla görülen stabilite problemlerinin hiçbiri görülmemiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde formülasyonların hızlandırılmış koşullara dahi dayanabildiği sonucuna varıldı. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda (300 ve 600 mg) etkin madde içeren F4P1, F4P2, F5P1, F5P2, F4P3, F4P4, F5P3 ve F5P4 kodlu formülasyonlarda sedimentasyon problemi görüldüğünden bu formülasyonlar

elenerek, ileriki çalışmalara hızlandırılmış stabilite testlerinden geçen formülasyonlarla devam edildi.

Isıtma-soğutma testi sonucunda, formülasyonların damlacık boyutlarında test sonunda belirgin bir artış olduğu, ancak her iki zaman noktasında da F3P1, F3P3 ve F3P4 formülasyonları hariç istenen şekilde nanoboyutta (<500 nm) kaldıkları görüldü. Hazırlanan formülasyonların Pdl değerleri test sonrasında da 0,2 değerinden küçük olduğundan, damlacık büyüklüğü dağılımının belirgin sıcaklık değişimlerinde dahi istenen şekilde homojen kaldığı sonucuna varıldı. Ayrıca, formülasyonların zeta potansiyellerinin de test sonrasında istenen değerlerde kaldığı saptandı (<-20 mV, >+20 mV). Elde edilen bulgular ile formülasyonlarda herhangi bir stabilite sorunu olmadığı sonucuna varıldı. Formülasyonların damlacık boyutunda artış görülmesine rağmen, literatürde geçen NE'lerin damlacık büyüklüğü sınırını (<500 nm) aşmaması, formülasyonların belirgin sıcaklık değişimlerine karşı dayanıklı olduklarını göstermektedir.

3 ay boyunca yürütülen fiziokimyasal stabilite testleri sonucunda, 3 farklı sıcaklıktaki saklama koşullarında bekletilen formülasyonların başlangıçta elde edilen fiziksel özelliklerinde değişim grlmediğinden, tüm formülasyonlar organoleptik açıdan stabil bulundu.

Emülsiyonların stabilitesinin saptanmasında pH analizi önemli bir parametredir. Zamanla ortaya çıkan pH değişiklikleri, formülasyonda kimyasal reaksiyonların meydana geldiğini ve ürün kalitesinin azaldığını göstermektedir. Çalışmamızda 3 aylık pH değerlerinde oda sıcaklığı ve buzdolabı koşullarında bekletilen formülasyonların pH değerlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, iklimlendirme kabininde (40°C±2,%75 R.N) bekletilenlerde hafif bir düşüş yaşanmıştır. Ancak pH'taki bu değişim formülasyonların görünümünü, damlacık çapı ve Pdl değerlerini etkilememiştir.

Elektriksel iletkenlik ölçümleri hazırlanan NE'lerin doğasını belirlemek için kullanıldı. Ayrıca, elektriksel iletkenlikte meydana gelen değişiklikler NE'lerde stabilite sorunlarını gösterebilen bir parametre olduğundan stabiliteye olan etkisi araştırıldı. Bu çalışmada elde edilen yüksek iletkenlik değerleri, NE'lerin istenen şekilde su içinde yağ (Y/S) tipi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, formülasyonlar farklı saklama koşullarında

bekletildiklerinde dahi iletkenliklerinde büyük bir değişiklik meydana gelmediğinden, bu durum formülasyonlarda faz dönüşümü gibi bir stabilite problemi görülmediğini ortaya koymaktadır.

NE'ler, Newtonian akış tipi gösteren, düşük viskoziteli sistemlerdir. Hazırlanan formülasyonların tümü NE'lerin doğası gereği düşük viskoziteli olup, Newtonian tipi akış göstermektedir. Tüm stabilite koşullarında, formülasyonların viskozite değerleri kabul edilebilir limitler içerisinde kalmıştır. Homojenitelerinde ve kıvamlarında herhangi bir değişim görülmemiştir. Piperin içeren NE'lerin boyut ve yüzey analizlerini incelemek amacıyla AFM analizi yapıldığında elde edilen 2D ve 3D görüntüler, formülasyonların homojen damlacık dağılımına sahip olduğunu göstermiştir.

Yapılan L929 hücre kültürü sitotoksikite testlerinde, hesaplanan IC₅₀ değerleri incelendiğinde düşük dozlarda nanoemülsiyonların toksik etkisi bulunmazken, konsantrasyon arttırıldığında hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve toksik etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. IC₅₀ değerleri, belirtilen miktarlarda nanoemülsiyon kullanıldığında L929 hücrelerinin yarısının inhibe olduğunu göstermektedir.

Formülasyonların saklama sırasında damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyelinde meydana gelen değişimleri saptamak kolloidal sistemlerin stabilitesini değerlendirmede iyi bir yöntemdir. Bu bağlamda, formülasyonların ortalama damlacık çapı, Pdl ve zeta potansiyeli ölçümleri 3 ay boyunca takip edildi. Ortalama damlacık çapı incelendiğinde, formülasyonların damlacık büyüklüklerinin üretim parametreleri ve piperin konsantrasyonundan bağımsız olarak istenen NE boyutlarına sahip olduğu görüldü (en küçük, 202,64 nm; en büyük, 223,1 nm). 3 ay boyunca buzdolabı ve oda sıcaklığında bekletilen formülasyonların damlacık boyutlarında değişim meydana gelmezken, iklimlendirme kabininde bekletilenlerin damlacık boyutlarında belirgin bir artışın meydana geldiği saptandı. Bu da formülasyonların buzdolabı ve oda sıcaklığındaki koşullarda stabilitesini uzun süre devam ettirebildiğini göstermektedir.

Düşük Pdl değerleri (sıfıra yakın) monodispers damlacık popülasyonunu gösterirken, Pdl değerlerinin 1'e yaklaşması damlacık boyutlarının geniş bir aralıkta ve düzensiz olduğuna işaret etmektedir. Bu çalışmada formülasyonların Pdl değerlerinin 3 ay

boyunca tüm koşullarda 0,2 civarında kaldığı ve homojen bir damlacık popülasyonuna sahip olduğu saptandı.

Zeta potansiyeli kolloidal dispersiyonların stabilitesinden sorumlu bir parametredir ve dispersiyondaki benzer yüklü partiküllerin birbirini itme derecesini ifade eder. Zeta değerlerinde azalma, formülasyonun flokülasyona daha fazla yatkın olduğunu göstermektedir. Çalışmadaki formülasyonların zeta potansiyellerinin 3 ayın sonunda dahi yüksek olduğu ve istenen kriterlere uygun olduğu görüldü (<-20 mV, $>+20$ mV).

Etkin madde içerik tayini verilerine göre piperin içeriği 3 farklı saklama koşulunda da yüksek oranda stabil kalmıştır. En yüksek etkin madde miktarına sahip olmasından dolayı piperin içeren NE formülasyonları için en uygun saklama koşulu olarak oda sıcaklığı seçilmiştir. Oda sıcaklığında bekletilen formülasyonlardan F3P2'nin, 3 ay sonunda en yüksek piperin içeriğine (% 98,74) sahip olduğu görülmüştür. Böylelikle, çevresel koşullara hassas doğal bir bileşen olan piperinin stabil NE formülasyonu geliştirilmiştir.

Deriden etkin maddelerin penetrasyonu, uygulanan formülasyon ile yakından ilgilidir. Etkin maddenin verildiği formülasyondan öncelikle salınması gerekmektedir. Bu nedenle, *in vitro* salım çalışmaları sonucu elde edilen etkin madde salım profilleri; etkin maddenin deriye etkili bir şekilde uygulanması açısından önemli bir kalite parametresidir. Bu amaçla tez çalışmasında, piperinin *in vitro* salımı diyaliz membran yöntemi ile incelenmiştir. Çalışma verilerine göre, 72 saatte piperinin % 81,92'sinin formülasyondan salınarak kontrollü salımın sağlanabildiği sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, piperinin biyolojik aktivitesinden en yüksek oranda yararlanılabilecek, nano skalada damlacık boyutuna sahip, fizikokimyasal olarak stabil olan topikal bir ürün dünyada ve ülkemizde ilk kez olarak bu tez çalışması kapsamında geliştirilmiştir.

- [1] Lin, J.Y. ve Fisher, D.E., (2007). "Melanocyte Biology and Skin Pigmentation", *Nature*, 445(7130): 843-850.
- [2] Park, H., (2009). "Cellular Mechanisms Regulating Human Melanogenesis", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(9):1493-1506.
- [3] Fistarol, S.K. ve Itin, P.H., (2010). "Disorders of Pigmentation", *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 8(3): 187-202.
- [4] Ortonne, J.P., (2012). *Vitiligo and Other Hypomelanoses of Hair and Skin*, 2.Baskı, Springer Science & Business Media, Berlin.
- [5] Casacci, M., (2007). "Comparison Between 308-Nm Monochromatic Excimer Light and Narrowband UVB Phototherapy (311–313 Nm) In The Treatment of Vitiligo—A Multicentre Controlled Study", *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology*, 21(7): 956-963.
- [6] Vinod, K., (2010). "Effect of UV Radiation In The Antivitiligo Therapy by Piperine Topical Formulation", *Arch Appl Sci Res*, 2: 165-169.
- [7] Faas, L., (2008). "In Vivo Evaluation of Piperine and Synthetic Analogues as Potential Treatments for Vitiligo Using A Sparsely Pigmented Mouse Model", *British Journal of Dermatology*, 158(5): 941-950.
- [8] Grimes, P.E., (2009). Management of Hyperpigmentation In Darker Racial Ethnic Groups. In *Seminars In Cutaneous Medicine and Surgery*, Frontline Medical Communications, Parsippany.
- [9] Ebanks, J.P., R.R. Wickett, ve Boissy, R.E., (2009). "Mechanisms Regulating Skin Pigmentation: The Rise and Fall of Complexion Coloration", *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9): 4066-4087.
- [10] Wu, D., (2002). "Cyclooxygenase Enzyme Inhibitory Compounds with Antioxidant Activities from Piper Methysticum (Kava Kava) Roots", *Phytomedicine*, 9(1): 41-47.
- [11] Singh, A. ve Duggal, S., (2009). "Piperine-Review of Advances In Pharmacology", *Int J Pharm Sci Nanotechnol*, 2: 615-20.
- [12] Lin, Z., (2007). "Amides from Piper Nigrum L. with Dissimilar Effects on Melanocyte Proliferation In-Vitro", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(4): 529-536.

- [13] Lin, Z., (1999). "Stimulation of Mouse Melanocyte Proliferation by Piper Nigrum Fruit Extract and Its Main Alkaloid, Piperine", *Planta Medica*, 65(07): 600-603.
- [14] Shah, P., D. Bhalodia, ve Shelat, P., (2010). "Nanoemulsion: A Pharmaceutical Review", *Systematic Reviews In Pharmacy*, 1(1): 24.
- [15] Mcclements, D.J., (2011). "Edible Nanoemulsions: Fabrication, Properties, and Functional Performance", *Soft Matter*, 7(6): 2297-2316.
- [16] Lovelyn, C. ve Attama, A.A., (2011). "Current State of Nanoemulsions In Drug Delivery", *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2(05): 626.
- [17] Solans, C., (2005). "Nano-Emulsions", *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 10(3): 102-110.
- [18] Guglielmini, G., (2008). "Nanostructured Novel Carrier for Topical Application", *Clinics In Dermatology*, 26(4): 341-346.
- [19] Bilbao-Sainz, C., (2010). "Nanoemulsions Prepared by A Low-Energy Emulsification Method Applied to Edible Films", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22): 11932-11938.
- [20] Qian, C., (2012). "Nanoemulsion Delivery Systems: Influence of Carrier Oil on B-Carotene Bioaccessibility", *Food Chemistry*, 135(3): 1440-1447.
- [21] Wulff-Pérez, M., (2009). "Stability of Emulsions for Parenteral Feeding: Preparation and Characterization of O/W Nanoemulsions with Natural Oils and Pluronic F68 as Surfactant", *Food Hydrocolloids*, 23(4): 1096-1102.
- [22] Sonnevile-Aubrun, O., J.T. Simonnet, ve L'alloret, F., (2004). "Nanoemulsions: A New Vehicle for Skincare Products", *Advances In Colloid and Interface Science*, 108: 145-149.
- [23] Tadros, T., (2004). "Formation and Stability of Nano-Emulsions", *Advances In Colloid and Interface Science*, 108: 303-318.
- [24] Mcclements, D.J. ve Rao, J., (2011). "Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate and Potential Toxicity", *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 51(4): 285-330.
- [25] Cortés-Muñoz, M., D. Chevalier-Lucia, ve Dumay, E., (2009). "Characteristics of Submicron Emulsions Prepared by Ultra-High Pressure Homogenisation: Effect of Chilled or Frozen Storage", *Food Hydrocolloids*, 23(3): 640-654.
- [26] Walstra, P., (1993). "Principles of Emulsion Formation", *Chemical Engineering Science*, 48(2): 333-349.
- [27] Mcclements, D.J., (2015). *Food Emulsions: Principles, Practices and Techniques*, 3.Baski, CRC Press., Florida.
- [28] Quin, C. ve Mc Clement, D., (2011). "Formation of Nano-Emulsions Stabilized by Model Food Grade Emulsifiers Using High Pressure Homogenization: Factors Effecting Particle Size", *Food Hydrocolloids*, 25(5): 1000-1008.

- [29] Solè, I., (2006). "Nano-Emulsions Preparation by Low Energy Methods In An Ionic Surfactant System", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 288(1): 138-143.
- [30] Solè, I., (2010). "Nano-Emulsions Prepared by The Phase Inversion Composition Method: Preparation Variables and Scale Up", *Journal of Colloid and Interface Science*, 344(2): 417-423.
- [31] Anton, N., Benoit, J.P. ve Saulnier, P., (2008). "Design and Production of Nanoparticles Formulated from Nano-Emulsion Templates—A Review", *Journal of Controlled Release*, 128(3): 185-199.
- [32] Koroleva, M.Y. ve Yurtov, E.V.E., (2012). "Nanoemulsions: The Properties, Methods of Preparation and Promising Applications", *Russian Chemical Reviews*, 81(1): 21-43.
- [33] Fainerman, V., (1988). "Principles of The Formation of Adsorption Layers of Surface-Active Substances on The Widening Surface of Aqueous-Solutions", *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, 62(2): 393-400.
- [34] Patel, R.P. ve Joshi, J.R., (2012). "An Overview on Nanoemulsion: A Novel Approach", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(12): 4640.
- [35] Sivakumar, M., S.Y. Tang, ve Tan, K.W., (2014). "Cavitation Technology—A Greener Processing Technique for The Generation of Pharmaceutical Nanoemulsions", *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6): 2069-2083.
- [36] Jaiswal, M., R. Dudhe, ve Sharma, P., (2015). "Nanoemulsion: An Advanced Mode of Drug Delivery System", *3 Biotech*, 5(2): 123-127.
- [37] Peshkovsky, A.S., S.L. Peshkovsky, ve Bystryak, S., (2013). "Scalable High-Power Ultrasonic Technology for The Production of Translucent Nanoemulsions", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 69: 77-82.
- [38] Maali, A. ve Mosavian, M.H., (2013). "Preparation and Application of Nanoemulsions In The Last Decade (2000–2010)", *Journal of Dispersion Science and Technology*, 34(1): 92-105.
- [39] Nakabayashi, K., (2011). "Highly Clear and Transparent Nanoemulsion Preparation Under Surfactant-Free Conditions Using Tandem Acoustic Emulsification", *Chemical Communications*, 47(20): 5765-5767.
- [40] Abismail, B., (1999). "Emulsification by Ultrasound: Drop Size Distribution and Stability", *Ultrasonics Sonochemistry*, 6(1): 75-83.
- [41] Kentish, S., (2008). "The Use of Ultrasonics for Nanoemulsion Preparation", *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2): 170-175.
- [42] Bhatt, A., (2013). "Novel Drug Delivery System-Nanoemulsions: A Recent Review", *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 1(03).
- [43] Baldyga, J., (2007). "Break Up of Nano-Particle Clusters In High-Shear Devices", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(9): 851-861.

- [44] Stone, H., B. Bentley, ve Leal, L., (1986). "Experimental Study of Transient Effects In The Breakup of Viscous Drops", *Journal of Fluid Mechanics*, 173(1): 131.
- [45] Grace, H.P., (1982). "Dispersion Phenomena In High Viscosity Immiscible Fluid Systems and Application of Static Mixers as Dispersion Devices In Such Systems", *Chemical Engineering Communications*, 14(3-6): 225-277.
- [46] Chime, S., F. Kenekwue, ve Attama, A., (2014). "Nanoemulsions—Advances In Formulation, Characterization and Applications In Drug Delivery", *Application of Nanotechnology In Drug Delivery*, 77-111.
- [47] Gutiérrez, J., (2008). "Nano-Emulsions: New Applications and Optimization of Their Preparation", *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 13(4): 245-251.
- [48] Dickinson, E., (1982). "Thermodynamic Aspects of Emulsion Phase Inversion", *Journal of Colloid and Interface Science*, 87(2): 416-423.
- [49] Salager, J. ve Forgiarini, A., (2004). "Emulsions, from Fundamentals to Practical Applications", *Adv. Colloid Interface Sci*, 108: 109-259.
- [50] Sajjadi, S., (2006). "Nanoemulsion Formation by Phase Inversion Emulsification: on The Nature of Inversion", *Langmuir*, 22(13): 5597-5603.
- [51] Forgiarini, A., (2001). "Formation of Nano-Emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature", *Langmuir*, 17(7): 2076-2083.
- [52] Sadurní, N., (2005). "Studies on The Formation of O/W Nano-Emulsions, by Low-Energy Emulsification Methods, Suitable for Pharmaceutical Applications", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(5): 438-445.
- [53] Aulton, M.E., (2002). *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, 2.Baskı, Churchill Livingstone, Amsterdam.
- [54] Barea, M., (2010). "Evaluation of Liposomes Coated with a Ph Responsive Polymer", *International Journal of Pharmaceutics*, 402(1): 89-94.
- [55] Samah, N.A., N. Williams, ve Heard, C.M., (2010). "Nanogel Particulates Located within Diffusion Cell Receptor Phases Following Topical Application Demonstrates Uptake Into and Migration Across Skin", *International Journal of Pharmaceutics*, 401(1): 72-78.
- [56] Saint Ruth, H., (1995). "Phase Studies and Particle Size Analysis of Oil-In-Water Phospholipid Microemulsions", *International Journal of Pharmaceutics*, 116(2): 253-261.
- [57] Li, X., (2011). "Microencapsulation of Nanoemulsions: Novel Trojan Particles for Bioactive Lipid Molecule Delivery", *International Journal of Nanomedicine*, 6(1): 1313-1325.
- [58] Silva, H.D., M.Â. Cerqueira, ve Vicente, A.A., (2012). "Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization", *Food and Bioprocess Technology*, 5(3): 854-867.

- [59] T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, Biyomedikal Cihaz Teknolojileri Spektrofotometre Cihazları, [Http://Www.Megep.Meb.Gov.Tr/Mte Program Modul/Moduller Pdf /Spektrofotometre%20Cihazlar%C4%B1.Pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte-program-modul/moduller-pdf/spektrofotometre%20cihazlar%C4%B1.pdf), 10 Ekim 2016.
- [60] Agrawal, Y., K.C. Petkar, ve Sawant, K.K., (2010). "Development, Evaluation and Clinical Studies of Acitretin Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Treatment of Psoriasis", *International Journal of Pharmaceutics*, 401(1): 93-102.
- [61] Touitou, E., (2000). "Ethosomes—Novel Vesicular Carriers for Enhanced Delivery: Characterization and Skin Penetration Properties", *Journal of Controlled Release*, 65(3): 403-418.
- [62] Bendas, E.R. ve Tadros, M.I., (2007). "Enhanced Transdermal Delivery of Salbutamol Sulfate Via Ethosomes", *Aaps Pharmscitech*, 8(4): 213-220.
- [63] Jain, S., (2007). "Formulation and Evaluation of Ethosomes for Transdermal Delivery of Lamivudine", *Aaps Pharmscitech*, 8(4): 249-257.
- [64] Dave, V., (2010). "Ethosome for Enhanced Transdermal Drug Delivery of Aceclofenac", *International Journal of Drug Delivery*, 2(1).
- [65] Lifshitz, I.M. ve Slyozov, V.V., (1961). "The Kinetics of Precipitation from Supersaturated Solid Solutions", *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 19(1-2): 35-50.
- [66] Wagner, C., (1961). "Theory of Aging and Precipitation Through Dissolution-Ostwald Ripening", *Z. Elektrochem.*, 581.
- [67] Taylor, P., (2003). "Ostwald Ripening In Emulsions: Estimation of Solution Thermodynamics of The Disperse Phase", *Advances In Colloid and Interface Science*, 106(1): 261-285.
- [68] Izquierdo, P., (2004). "Phase Behavior and Nano-Emulsion Formation by The Phase Inversion Temperature Method", *Langmuir*, 20(16): 6594-6598.
- [69] Courrier, H.M., T.F. Vandamme, ve Krafft, M.P., (2004). "Reverse Water-In-Fluorocarbon Emulsions and Microemulsions Obtained with a Fluorinated Surfactant", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 244(1): 141-148.
- [70] Izquierdo, P., (2002). *Studies on Nano-Emulsion Formation and Stability*, Yüksek Lisans Tezi, University of Barcelona, Spain.
- [71] Bielinska, A.U., (2008). "Nasal Immunization with A Recombinant HIV Gp120 and Nanoemulsion Adjuvant Produces Th1 Polarized Responses and Neutralizing Antibodies to Primary HIV Type 1 Isolates", *AIDS Research and Human Retroviruses*, 24(2): 271-281.
- [72] Makidon, P.E., (2008). "Pre-Clinical Evaluation of A Novel Nanoemulsion-Based Hepatitis B Mucosal Vaccine", *Plos One*, 3(8): 2954.
- [73] Primo, F.L., (2007). "Magnetic Nanoemulsions as Drug Delivery System for Foscan®: Skin Permeation and Retention In Vitro Assays For Topical Application in Photodynamic Therapy (PDT) of Skin Cancer", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1): 354-357.

- [74] Pires, A., (2009). "Intranasal Drug Delivery: How, Why and What For?", *J Pharm Pharm Sci*, 12 (3), 288-311.
- [75] Ugwoke, M.I., (2005). "Nasal Mucoadhesive Drug Delivery: Background, Applications, Trends and Future Perspectives", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11): 1640-1665.
- [76] Pardridge, W.M., (1999). "Non-Invasive Drug Delivery to The Human Brain Using Endogenous Blood–Brain Barrier Transport Systems", *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(2): 49-59.
- [77] De Graaff, W. Ve Szegedi, A., (2007). *Delivery System for Risperidone*, Google Patents.
- [78] Mistry, A., S. Stolnik, Ve Illum, L., (2009). "Nanoparticles for Direct Nose-to-Brain Delivery of Drugs", *International Journal of Pharmaceutics*, 379(1): 146-157.
- [79] Csaba, N., M. Garcia-Fuentes, Ve Alonso, M.J., (2009). "Nanoparticles for Nasal Vaccination", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2): 140-157.
- [80] Patel, R. Ve Patel, K., (2010). "Advances in Novel Parenteral Drug Delivery Systems", *Asian Journal of Pharmaceutics*, 4(3): 193.
- [81] Araújo, F., (2011). "Development and Characterization of Parenteral Nanoemulsions Containing Thalidomide", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(3): 238-245.
- [82] Müller-Goymann, C., (2004). "Physicochemical Characterization of Colloidal Drug Delivery Systems Such as Reverse Micelles, Vesicles, Liquid Crystals and Nanoparticles for Topical Administration", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58(2): 343-356.
- [83] Gaur, P., (2009). "Transdermal Drug Delivery System: A Review", *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2(1): 14-20.
- [84] Thiagarajan, P., (2011). "Nanoemulsions for Drug Delivery Through Different Routes", *Research in Biotechnology*, 2(3).
- [85] Shakeel, F. Ve Ramadan, W., (2010). "Transdermal Delivery of Anticancer Drug Caffeine from Water-in-Oil Nanoemulsions", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1): 356-362.
- [86] Ktistis, G. Ve Niopas, I., (1998). "A Study on The In-Vitro Percutaneous Absorption of Propranolol from Disperse Systems", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(4): 413-418.
- [87] Gasco, M., M. Gallarate, Ve Pattarino, F., (1991). "In Vitro Permeation of Azelaic Acid from Viscosized Microemulsions", *International Journal of Pharmaceutics*, 69(3): 193-196.
- [88] Bregni, C., (2008). "Release Study of Diclofenac from New Carbomer Gels", *Pak. J. Pharm. Sci*, 21(1): 12-16.
- [89] Mansour, H.M., Y.-S. Rhee, Ve Wu, X., (2009). "Nanomedicine in Pulmonary Delivery", *Int J Nanomedicine*, 4: 299-319.

- [90] Bivas-Benita, M., (2004). "Cationic Submicron Emulsions for Pulmonary DNA Immunization", *Journal of Controlled Release*, 100(1): 145-155.
- [91] Lawrence, M.J. ve Rees, G.D., (2000). "Microemulsion-Based Media as Novel Drug Delivery Systems", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45(1): 89-121.
- [92] Wickett, R.R. ve Visscher, M.O., (2006). "Structure and Function of The Epidermal Barrier", *American Journal of Infection Control*, 34(10): S98-S110.
- [93] Celleno, L. ve Tamburi, F., (2009). "Structure and Function of The Skin", *Nutritional Cosmetics: Beauty from within*, 3-45.
- [94] Bouwstra, J. ve Honeywell-Nguyen, P., (2002). "Skin Structure and Mode of Action of Vesicles", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: S41-S55.
- [95] Darlenski, R. ve Fluhr, J.W., (2012). "Influence of Skin Type, Race, Sex, and Anatomic Location on Epidermal Barrier Function", *Clinics In Dermatology*, 30(3): 269-273.
- [96] Costin, G.-E. ve Hearing, V.J., (2007). "Human Skin Pigmentation: Melanocytes Modulate Skin Color in Response to Stress", *The FASEB Journal*, 21(4): 976-994.
- [97] Anissimov, Y.G., (2013). "Mathematical and Pharmacokinetic Modelling of Epidermal and Dermal Transport Processes", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(2): 169-190.
- [98] Baroni, A., (2012). "Structure and Function of The Epidermis Related to Barrier Properties", *Clinics in Dermatology*, 30(3): 257-262.
- [99] Jepps, O.G., (2013). "Modeling The Human Skin Barrier—Towards A Better Understanding of Dermal Absorption", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(2): 152-168.
- [100] Lai-Cheong, J.E. ve Mcgrath, J.A., (2009). "Structure and Function of Skin, Hair and Nails", *Medicine*, 37(5): 223-226.
- [101] Mescher, A.L., (2013). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*, 14.Baskı, McGraw-Hill, New York.
- [102] Darlenski, R., (2009). "Non-Invasive In Vivo Methods for Investigation of The Skin Barrier Physical Properties", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72(2): 295-303.
- [103] Shai, A., R. Baran, ve Maibach, H.I., (2009). *Handbook of Cosmetic Skin Care*, 2.Baskı, Informa, İsviçre.
- [104] Menon, G.K., (2002). "New Insights Into Skin Structure: Scratching The Surface", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: S3-S17.
- [105] Chesahna Kindred, M., (2009). "Overview of The Structure and Function of Ethnic Skin", *Nutritional Cosmetics: Beauty from within*, 47.
- [106] Tang, W. ve Bhushan, B., (2010). "Adhesion, Friction and Wear Characterization of Skin and Skin Cream Using Atomic Force Microscope", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1): 1-15.

- [107] Venus, M., J. Waterman, ve McNab, I., (2011). "Basic Physiology of The Skin", *Surgery*, 29(10): 471-474.
- [108] Burgdorf, W., (2009). *Braun-Falco's Dermatology*, 3.Baskı, Springer, Heidelberg.
- [109] Corcuff, P., (1990). "Racial Differences in Corneocytes. A Comparison Between Black, White and Oriental Skin", *Acta Dermato-Venereologica*, 71(2): 146-148.
- [110] Palmer, C.N., (2006). "Common Loss-of-Function Variants of The Epidermal Barrier Protein Filaggrin Are A Major Predisposing Factor for Atopic Dermatitis", *Nature Genetics*, 38(4): 441-446.
- [111] Mitragotri, S., (2011). "Mathematical Models of Skin Permeability: An Overview", *International Journal of Pharmaceutics*, 418(1): 115-129.
- [112] Notman, R. ve Anwar, J., (2013). "Breaching The Skin Barrier—Insights from Molecular Simulation of Model Membranes", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(2): 237-250.
- [113] Nishifuji, K. ve Yoon, J.S., (2013). "The Stratum Corneum: The Rampart of The Mammalian Body", *Veterinary Dermatology*, 24(1): 60-16.
- [114] Lodén, M., (1996). "Urea-Containing Moisturizers Influence Barrier Properties of Normal Skin", *Archives of Dermatological Research*, 288(2): 103-107.
- [115] Holleran, W.M., Y. Takagi, ve Uchida, Y., (2006). "Epidermal Sphingolipids: Metabolism, Function, and Roles in Skin Disorders", *FEBS Letters*, 580(23): 5456-5466.
- [116] Forslind, B., (1997). "A Novel Approach to The Understanding of Human Skin Barrier Function", *Journal of Dermatological Science*, 14(2): 115-125.
- [117] Thai, K.E., (2008). "Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine", *Australasian Journal of Dermatology*, 49(3): 175-175.
- [118] Norlén, L., (1998). "A New HPLC-Based Method for The Quantitative Analysis of Inner Stratum Corneum Lipids with Special Reference to The Free Fatty Acid Fraction", *Archives of Dermatological Research*, 290(9): 508-516.
- [119] Wertz, P., (2006). "Biochemistry of Human Stratum Corneum Lipids", *Skin Barrier*, 33-42.
- [120] Elias, P.M., (2002). "Origin of The Epidermal Calcium Gradient: Regulation by Barrier Status and Role of Active Vs Passive Mechanism", *Journal of Investigative Dermatology*, 119(6): 1269-1274.
- [121] Wermter, S., (2015). "Self-Organizing Neural Integration of Pose-Motion Features for Human Action Recognition", *Front Neurobot*, 9: 3.
- [122] Plensdorf, S. ve Martinez, J., (2009). "Common Pigmentation Disorders", *American Family Physician*, 79(2): 109-116.
- [123] Rouzaud, F., (2005). "MC1R and The Response of Melanocytes to Ultraviolet Radiation", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571(1): 133-152.

- [124] Yamaguchi, Y. ve Hearing, V.J., (2009). "Physiological Factors That Regulate Skin Pigmentation", *Biofactors*, 35(2): 193-199.
- [125] Fitzpatrick, T.B. ve Breathnach, A., (1963). "The Epidermal Melanin Unit System", *Dermatologische Wochenschrift*, 147: 481-489.
- [126] Cichorek, M., (2013). "Skin Melanocytes: Biology and Development", *Postepy Dermatol Alergol*, 30(1): 30-41.
- [127] Jimbow, K., (1976). "Some Aspects of Melanin Biology: 1950–1975", *Journal of Investigative Dermatology*, 67(1): 72-89.
- [128] Kobayashi, N., (1998). "Supranuclear Melanin Caps Reduce Ultraviolet Induced DNA Photoproducts in Human Epidermis", *Journal of Investigative Dermatology*, 110(5): 806-810.
- [129] Lo, J.A. ve Fisher, D.E., (2014). "The Melanoma Revolution: from UV Carcinogenesis to A New Era in Therapeutics", *Science*, 346(6212): 945-949.
- [130] Chakraborty, A.K., (1996). "Production and Release of Proopiomelanocortin (POMC) Derived Peptides by Human Melanocytes and Keratinocytes in Culture: Regulation by Ultraviolet B", *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1313(2): 130-138.
- [131] Funasaka, Y., (1998). "Modulation of Melanocyte-Stimulating Hormone Receptor Expression on Normal Human Melanocytes: Evidence for A Regulatory Role of Ultraviolet B, Interleukin-1 , Interleukin-1 , Endothelin-1 and Tumour Necrosis Factor", *British Journal of Dermatology*, 139(2): 216-224.
- [132] Tada, A., (1998). "Endothelin-1 is A Paracrine Growth Factor That Modulates Melanogenesis of Human Melanocytes and Participates in Their Responses to Ultraviolet Radiation", *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of The American Association for Cancer Research*, 9(7): 575-584.
- [133] Abdel-Malek, Z., (2000). "The Melanocortin-1 Receptor is A Key Regulator of Human Cutaneous Pigmentation", *Pigment Cell Research*, 13(S8): 156-162.
- [134] Hirobe, T., (2005). "Role of Keratinocyte-Derived Factors Involved in Regulating The Proliferation and Differentiation of Mammalian Epidermal Melanocytes", *Pigment Cell Research*, 18(1): 2-12.
- [135] Simon, J.D., (2009). "Current Challenges in Understanding Melanogenesis: Bridging Chemistry, Biological Control, Morphology, and Function", *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22(5): 563-579.
- [136] Dooley, T. ve Hori, W., (1997). *Drug Discovery Approaches for Developing Cosmeceuticals: Advanced Skin Care and Cosmetic Products*, 1.Baskı, IBC Library Series, Southborough.
- [137] Riley, P., (1997). "Melanin", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29(11): 1235-1239.
- [138] Bush, W.D. ve Simon, J.D., (2007). "Quantification of Ca²⁺ Binding to Melanin Supports The Hypothesis That Melanosomes Serve A Functional Role in Regulating Calcium Homeostasis", *Pigment Cell Research*, 20(2): 134-139.

- [139] Fitzpatrick, T.B., M. Miyamoto, ve Ishikawa, K., (1967). "The Evolution of Concepts of Melanin Biology", *Archives of Dermatology*, 96(3): 305-323.
- [140] Hearing, V.J., (2011). "Determination of Melanin Synthetic Pathways", *Journal of Investigative Dermatology*, 131: 8-11.
- [141] Sugumaran, M., (1991). "Molecular Mechanisms for Mammalian Melanogenesis Comparison with Insect Cuticular Sclerotization", *FEBS Letters*, 293(1-2): 4-10.
- [142] Del Marmol, V. ve Beermann, F., (1996). "Tyrosinase and Related Proteins in Mammalian Pigmentation", *FEBS Letters*, 381(3): 165-168.
- [143] Slominski, A., (2004). "Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation", *Physiological Reviews*, 84(4): 1155-1228.
- [144] Yamaguchi, Y., M. Brenner, ve Hearing, V.J., (2007). "The Regulation of Skin Pigmentation", *Journal of Biological Chemistry*, 282(38): 27557-27561.
- [145] Ito, S. ve Wakamatsu, K., (2011). "Diversity of Human Hair Pigmentation as Studied by Chemical Analysis of Eumelanin and Pheomelanin", *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(12): 1369-1380.
- [146] Abdel-Malek, Z.A., A.L. Kadekaro, ve Swope, V.B., (2010). "Stepping Up Melanocytes to The Challenge of UV Exposure", *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23(2): 171-186.
- [147] Sulaimon, S.S. ve Kitchell, B.E., (2003). "The Biology of Melanocytes", *Veterinary Dermatology*, 14(2): 57-65.
- [148] Plonka, P., (2009). "What Are Melanocytes Really Doing All Day Long?", *Experimental Dermatology*, 18(9): 799-819.
- [149] Hearing, V.J., (2005). "Biogenesis of Pigment Granules: A Sensitive Way to Regulate Melanocyte Function", *Journal of Dermatological Science*, 37(1): 3-14.
- [150] Watabe, H., (2008). "Involvement of Dynein and Spectrin with Early Melanosome Transport and Melanosomal Protein Trafficking", *Journal of Investigative Dermatology*, 128(1): 162-174.
- [151] Schiaffino, M.V., (2010). "Signaling Pathways in Melanosome Biogenesis and Pathology", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(7): 1094-1104.
- [152] Schallreuter, K., (1998). "What Controls Melanogenesis?", *Experimental Dermatology*, 7(4): 143-150.
- [153] Zelikson, A.S., (1967). *Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin*, 1. Baski, Lea & Febiger, Philadelphia.
- [154] Rothman, S., H.F. Krysa, ve Smiljanic, A.M., (1946). "Inhibitory Action of Human Epidermis on Melanin Formation", *Experimental Biology and Medicine*, 62(2): 208-209.
- [155] Halprin, K.M. ve Ohkawara, A., (1966). "Glutathione and Human Pigmentation", *Archives of Dermatology*, 94(3): 355-357.

- [156] Satoh, G.Z. ve Mishima, Y., (1966). "Subcellular Enzyme-Substrate Relationships Between Amelanotic and Melanotic Malignant Melanoma", Federation Proceedings, 20814-3998.
- [157] Chian, L.T. ve Wilgram, G.F., (1967). "Tyrosinase Inhibition: Its Role in Suntanning and in Albinism", Science, 155(3759): 198-200.
- [158] Snell, R., (1967). "Hormonal Control of Pigmentation in Man and Other Mammals", Advances in Biology of Skin, 8: 447-466.
- [159] Lerner, A.B. ve Mcguire, J.S., (1961). "Effect of Alpha-and Betamelanocyte Stimulating Hormones on The Skin Colour of Man", Nature, 189: 176.
- [160] Hu, F., (1968). "Melanocytes and Pigmentation", J. Soc. Cosmetic Chemists, 19: 565-580.
- [161] Quevedo, W., (1965). "Melanocyte Populations in UV-irradiated Human Skin¹", Journal of Investigative Dermatology, 45(4): 295-298.
- [162] Pathak, M., S. Sinesi, ve Szabo, G., (1965). "The Effect of A Single Dose of Ultraviolet Radiation on Epidermal Melanocytes¹", Journal of Investigative Dermatology, 45(6): 520-528.
- [163] Staricco, R.J. ve Pinkus, H., (1957). "Quantitative and Qualitative Data on The Pigment Cells of Adult Human Epidermis", Journal of Investigative Dermatology, 28(1): 33-45.
- [164] Staricco, R.J., (1957). "Qualitative and Quantitative Data on Melanocytes in Human Epidermis Treated with Thorium X¹", Journal of Investigative Dermatology, 29(3): 185-195.
- [165] Tsatmali, M., J. Ancans, ve Thody, A.J., (2002). "Melanocyte Function and Its Control by Melanocortin Peptides", Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 50(2): 125-133.
- [166] Yaar, M., (2008). Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8.Baskı, McGraw-Hill, New York.
- [167] Pašić, A., Wolff, K., Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A.S. ve Leffell, D.J., (2009). Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7.Baskı, Acta Dermatovenerologica, Croatica.
- [168] Dessinioti, C., (2009). "A Review of Genetic Disorders of Hypopigmentation: Lessons Learned from The Biology of Melanocytes", Experimental Dermatology, 18(9): 741-749.
- [169] Dogramaci, A.C., (2011). "Vitiligo Dışı Hipopigmentasyon Bozukluklari/Hypopigmented Disorders Except Vitiligo", Turkderm, 45: 122.
- [170] Schallreuter, K.U., (2008). "Regulation of Melanogenesis—Controversies and New Concept", Experimental Dermatology, 17(5): 395-404.
- [171] Chia, K. ve Tey, H., (2013). "Approach to Hypohidrosis", Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology, 27(7): 799-804.

- [172] Tey, H., (2010). "Approach to Hypopigmentation Disorders in Adults", *Clinical and Experimental Dermatology*, 35(8): 829-834.
- [173] Nicolaidou, E. ve Katsambas, A.D., (2014). "Pigmentation Disorders: Hyperpigmentation and Hypopigmentation", *Clinics in Dermatology*, 32(1): 66-72.
- [174] Nicolaidou, E., (2012). "Childhood-and Later-Onset Vitiligo Have Diverse Epidemiologic and Clinical Characteristics", *Journal of The American Academy of Dermatology*, 66(6): 954-958.
- [175] Alikhan, A., (2011). "Vitiligo: A Comprehensive Overview: Part I. Introduction, Epidemiology, Quality of Life, Diagnosis, Differential Diagnosis, Associations, Histopathology, Etiology, and Work-Up", *Journal of The American Academy of Dermatology*, 65(3): 473-491.
- [176] Cui, J., L.Y. Shen, ve Wang, G.C., (1991). "Role of Hair Follicles In The Repigmentation of Vitiligo", *Journal of Investigative Dermatology*, 97(3): 410-416.
- [177] Gawkrödger, D., (2008). "Guideline for The Diagnosis and Management of Vitiligo", *British Journal of Dermatology*, 159(5): 1051-1076.
- [178] Felsten, L.M., A. Alikhan, ve Petronic-Rosic, V., (2011). "Vitiligo: A Comprehensive Overview: Part II: Treatment Options and Approach to Treatment", *Journal of The American Academy of Dermatology*, 65(3): 493-514.
- [179] Nicolaidou, E., (2007). "Efficacy, Predictors of Response, and Long-Term Follow-Up in Patients with Vitiligo Treated with Narrowband UVB Phototherapy", *Journal of The American Academy of Dermatology*, 56(2): 274-278.
- [180] Nicolaidou, E., (2009). "Narrowband Ultraviolet B Phototherapy and 308-Nm Excimer Laser in The Treatment of Vitiligo: A Review", *Journal of The American Academy of Dermatology*, 60(3): 470-477.
- [181] Spritz, R.A., (1992). "The Molecular Basis of Human Piebaldism", *Pigment Cell Research*, 5(5): 340-343.
- [182] Singh, Y.N. ve Singh, N.N., (2002). "Therapeutic Potential of Kava in The Treatment of Anxiety Disorders", *CNS Drugs*, 16(11): 731-743.
- [183] Vinod, K., D. Santosha, ve Anbazhagan, S., (2011). "Formulation and Evaluation of Piperine Cream: A New Herbal Dimensional Approach for Vitiligo Patients", *Int J Pharm Pharm Sci*, 3(2): 2933.
- [184] Li, S., (2007). "Antidepressant Like Effects of Piperine in Chronic Mild Stress Treated Mice and Its Possible Mechanisms", *Life Sciences*, 80(15): 1373-1381.
- [185] Kulkarni, S.K., M.K. Bhutani, ve Bishnoi, M., (2008). "Antidepressant Activity of Curcumin: Involvement of Serotonin and Dopamine System", *Psychopharmacology*, 201(3): 435-442.
- [186] Badmaev, V., M. Majeed, ve Norkus, E.P., (1999). "Piperine, An Alkaloid Derived from Black Pepper Increases Serum Response of Beta-Carotene During 14-Days of Oral Beta-Carotene Supplementation", *Nutrition Research*, 19(3): 381-388.

- [187] Lambert, J.D., (2004). "Piperine Enhances The Bioavailability of The Tea Polyphenol (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in Mice," *The Journal of Nutrition*, 134(8): 1948-1952.
- [188] Choi, B.-M., (2007). "Piperine Protects Cisplatin-Induced Apoptosis Via Heme Oxygenase-1 Induction in Auditory Cells", *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(9): 615-622.
- [189] Selvendiran, K., (2005). "Preliminary Study on Inhibition of Genotoxicity by Piperine in Mice", *Fitoterapia*, 76(3): 296-300.
- [190] Selvendiran, K., S.M. Banu, ve Sakthisekaran, D., (2005). "Oral Supplementation of Piperine Leads to Altered Phase II Enzymes and Reduced DNA Damage and DNA-Protein Cross Links in Benzo (A) Pyrene Induced Experimental Lung Carcinogenesis", *Molecular and Cellular Biochemistry*, 268(1-2): 141-147.
- [191] Park, B.S., (2007). "Antiplatelet Effects of Acidamides Isolated from The Fruits of Piper Longum L.", *Phytomedicine*, 14(12): 853-855.
- [192] Bezerra, D., (2006). "In Vivo Growth-Inhibition of Sarcoma 180 by Piplartine and Piperine, Two Alkaloid Amides from Piper", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(6): 801-807.
- [193] Taqvi, S.I.H., A.J. Shah, ve Gilani, A.H., (2008). "Blood Pressure Lowering and Vasomodulator Effects of Piperine", *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 52(5): 452-458.
- [194] Matsuda, H., (2008). "Protective Effects of Amide Constituents from The Fruit of Piper Chaba on D-Galactosamine/TNF-A-Induced Cell Death in Mouse Hepatocytes", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(6): 2038-2042.
- [195] Panda, S. ve Kar, A., (2003). "Piperine Lowers The Serum Concentrations of Thyroid Hormones, Glucose and Hepatic 5' D Activity in Adult Male Mice", *Hormone and Metabolic Research*, 35(09): 523-526.
- [196] Duessel, S., R.M. Heuertz, ve Ezekiel, U.R., (2008). "Growth Inhibition of Human Colon Cancer Cells by Plant Compounds", *Clinical Laboratory Science*, 21(3): 151.
- [197] Kim, S.H. ve Lee, Y.C., (2009). "Piperine Inhibits Eosinophil Infiltration and Airway Hyperresponsiveness by Suppressing T Cell Activity and Th2 Cytokine Production in The Ovalbumin-Induced Asthma Model", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(3): 353-359.
- [198] Husain, I., (1982). "Demonstration of Tyrosinase in The Vitiligo Skin of Human Beings by A Sensitive Fluorometric Method as Well as by 14 C (U)-L-Tyrosine Incorporation into Melanin", *Journal of Investigative Dermatology*, 78(3): 243-252.
- [199] Njoo, M.D. ve Westerhof, W., (2001). "Vitiligo", *American Journal of Clinical Dermatology*, 2(3): 167-181.
- [200] Le Poole, I.C., (1996). "Presence of T Cells and Macrophages in Inflammatory Vitiligo Skin Parallels Melanocyte Disappearance", *The American Journal of Pathology*, 148(4): 1219.

- [201] Horikawa, T., (1996). "DOPA-Negative Melanocytes in The Outer Root Sheath of Human Hair Follicles Express Premelanosomal Antigens But Not A Melanosomal Antigen Or The Melanosome-Associated Glycoproteins Tyrosinase, TRP-1, and TRP-2", *Journal of Investigative Dermatology*, 106(1): 28-35.
- [202] ORTONNE, J.P. ve Bose, S.K., (1993). "Vitiligo: Where Do We Stand?", *Pigment Cell Research*, 6(2): 61-72.
- [203] Orecchia, G., (1998). "Topical Photochemotherapy of Vitiligo with A New Khellin Formulation: Preliminary Clinical Results", *Journal of Dermatological Treatment*, 9(2): 65-69.
- [204] Weinstock, M.A., (1995). "Overview of Ultraviolet Radiation and Cancer: What is The Link? How Are We Doing?", *Environmental Health Perspectives*, 103(8): 251.
- [205] Schmitz, S., (1994). "Long-Wave Ultraviolet Radiation (UVA) and Skin Cancer", *Der Hautarzt; Zeitschrift Fur Dermatologie, Venerologie, Und Verwandte Gebiete*, 45(8): 517-525.
- [206] Koppel, D.E., (1972). "Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants", *The Journal of Chemical Physics*, 57(11): 4814-4820.
- [207] Mosmann, T., (1983). "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays", *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
- [208] Bonate, P.L. ve Howard, D.R., (2011). *Pharmacokinetics In Drug Development: Advances and Applications*, 3.Baskı, Springer Science & Business Media, Berlin.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Burcu ÖZKAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 20.04.1993/ İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce, Almanca, Korece
E-posta : burcu_ozkan93@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Kimya Mühendisliği	Yıldız Teknik Üniversitesi	2015
Lise	Fen bilimleri	Samiha Ayverdi Anadolu Lisesi	2011

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2015	Unipharma Kozmetik Araştırma Geliştirme Eğitim Danışmanlık Tic. San. Ltd. Şti.	Ar-Ge Mühendisi
2014	Ziylan Taban San. ve Tic. A.Ş.	Stajyer
2013	PharmaVision İlaç	Stajyer

YAYINLARI

Bildiri

1. Özkan, B., Budama Kılınç, Y., Çakır Koç, R. ve Altuntaş, E., (2016). "Preperation and Characterization of Topical Nanoemulsions Containing Piperin", Nanobilim ve Nanoteknoloji Kongresi, Gebze Teknik Üniversitesi, 03-05 Haziran 2016, Kocaeli, Türkiye.
2. Altuntaş, E., Dalo, F., Özkan, B. ve Yener, F.G., (2015). "Nanomateriyallerin Kozmetikte Kullanımı ve Güvenlik Değerlendirilmesine Genel Bir Bakış", 2. İlaç ve Eczacılık Kongresi, 27-29 Kasım 2015, İstanbul, Türkiye.
3. Dalo, F., Altuntaş, E., Özkan, B. ve Yener, F.G., (2015). "Üç Yaş Altı Bebek Bakım Ürünlerinde Güvenlik Değerlendirilmesi ve Üretim Sırasında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar", 2. İlaç ve Eczacılık Kongresi, 27-29 Kasım 2015, İstanbul, Türkiye.
4. Altuntaş, E., Dalo, F., Özkan, B. ve Yener, F.G., (2015). "Development of A New Performance Test Method to Evaluate The Efficacy of Hair Colour Protective Products", DRD 2015–International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, 15-17 Ekim 2015, Eskişehir, Türkiye.
5. Özkan, B., Altuntaş, E. ve Dalo, F., (2015). "Tissue Engineering Based on 3d Printing Technology", DRD 2015–International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, 15-17 Ekim 2015, Eskişehir, Türkiye.
6. Altuntaş, E., Özkan, B. ve Budama Kılınç, Y., (2015). "Kozmetikte Yeni Bir Yaklaşım: Bitkisel Kök Hücre Teknolojisi", 1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi, 2-4 Eylül 2015, Bolu, Türkiye.
7. Özkan, B. ve Altuntas, E., (2014). "Development of Cosmetic Nanoemulsions: Key Criteria and Formulation Approaches", Skin Forum 14th Annual Meeting, 4-5 Eylül 2014, Prag-Çek Cumhuriyeti.

Kitap

1. Budama-Kılınç, Y., Çakır-Koc, R., Kurt, İ., Gozutok, K., Ozkan, B., Ozkan, B. ve Isıldak, İ. (2016). Polymer-based Biocomposites, Frontiers in Biomaterials, Elsevier, Amsterdam.
2. Altuntas E., Ozkan B. ve Yener G., (2016). Porous Scaffolds, Nanobiomaterials Science, Development and Evaluation, Elsevier, Amsterdam.

Proje

1. Hiperpigmentasyon Problemine Yönelik Ülkemizde Üretilen Çeşitli Bitkisel Ekstreler Kullanılarak Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu. KOSGEB Araştırma-Geliştirme, İnovasyon ve Endüstriyel Uygulama Destek Programı. Mart 2016-Mart 2017.

2. Influenza A Enfeksiyonu Tanısı İçin (M2e) Peptidine Spesifik IgY Antikoruна Dayalı İmmünokromatografi Yöntemi ile Hızlı Tanı Kiti Geliştirilmesi, TÜBİTAK 1003-Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projeleri Destekleme Programı. 15.10.2015- 15.10.2017.
3. Ülkemizde Üretilen Çeşitli Bitkisel Yağlar ve Balın Yaşlanma Karşıtı Nanoemülsiyonlarının Geliştirilmesi. TÜBİTAK 1512 Girişimcilik Aşamalı Destek Projesi, Ocak 2015-Ocak 2016.

