

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİSEL İÇERİKLİ YAŞLANMA KARŞITI  
NANOFORMÜLASYON GELİŞTİRİLMESİ

Çiğdem ÇETİN ALUÇ

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Aralık, 2022

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL İÇERİKLİ YAŞLANMA KARŞITI  
NANOFORMÜLASYON GELİŞTİRİLMESİ**

Çiğdem ÇETİN ALUÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 22.12.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ  
Yıldız Teknik Üniversitesi  
Danışman

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ, Danışman  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN, Üye  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ, Üye  
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Musa TÜRKER, Üye  
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Murat KARTAL, Üye  
Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ sorumluluğunda tarafımda hazırlanan Bitkisel İçerikli Yaşlanma Karşıtı Nanoformülasyon Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Çiğdem ÇETİN ALUÇ

İmza



Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün FDK-2021-4602 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



*Aileme  
ve  
biricik eşime*

## TEŞEKKÜR

---

Doktora eğitimimin ilk gününden itibaren ve tez çalışması sürecimde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, ilgisini ve önerilerini benden esirgemeyen, desteğini her adımda hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmaları sürecimde desteklerini gördüğüm, *in silico* analizlerinin gerçekleştirilmesinde değerli emekleri olan sayın hocam Doç. Dr. Serda KECEL GÜNDÜZ' e teşekkür ederim.

Doktora eğitimi sürecinde desteklerini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Burçin PİŞKİN' e teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca, bana yol gösteren ve çalışmalarımın şekillenmesinde büyük emeği olan kıymetli arkadaşım Bahar GÖK'e ve ihtiyaç duyduğum an desteklerini eksik etmeyen değerli arkadaşım Ozan Barış KÜRTÜR ve Burçak YAVUZ' a teşekkür ederim.

Stabilite analizleri süresince desteklerini aldığım değerli meslektaşlarım Kaan KIRAYLAR ve Yüksel ÇINAR'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde bana sevgilerini ve desteklerini sunan, beni her daim cesaretlendiren sevgili annem Necibe ÇETİN'e, değerli babam Metin ÇETİN'e ve kardeşim Çağrı ÇETİN'e teşekkür ederim.

Her koşulda, her adımda ve aldığım her kararda sevgisi ve şefkati ile yanımda olan, her daim anlayış ve desteğini gördüğüm hayat arkadaşım, biricik eşim Kadir ALUÇ' a teşekkür ederim.

Çiğdem ÇETİN ALUÇ

# İÇİNDEKİLER

|                                                                |          |
|----------------------------------------------------------------|----------|
| SİMGE LİSTESİ                                                  | iix      |
| KISALTMA LİSTESİ                                               | x        |
| ŞEKİL LİSTESİ                                                  | xii      |
| TABLO LİSTESİ                                                  | xiv      |
| ÖZET                                                           | xvii     |
| ABSTRACT                                                       | xviii    |
| <b>1 GİRİŞ</b>                                                 | <b>1</b> |
| 1.1 Literatür Özeti .....                                      | 1        |
| 1.2 Tezin Amacı.....                                           | 2        |
| 1.3 Hipotez .....                                              | 3        |
| <b>2 GENEL BİLGİLER</b>                                        | <b>4</b> |
| 2.1 Deri ve Görevleri.....                                     | 4        |
| 2.2 Derinin Yapısı .....                                       | 4        |
| 2.2.1 Epidermis.....                                           | 5        |
| 2.2.2 Dermis.....                                              | 8        |
| 2.2.3 Hipodermis.....                                          | 8        |
| 2.3 Cilt Yaşlanması .....                                      | 9        |
| 2.3.1 Fotoyaşlanma.....                                        | 10       |
| 2.4 Kozmetikler ve Kozmetik Sanayii.....                       | 11       |
| 2.5 Kozmetik Ürünlerde Nanoteknolojinin Kullanımı.....         | 15       |
| 2.5.1 Polimerik Nanopartiküller.....                           | 16       |
| 2.5.2 Çift Emülsiyon Yöntemi.....                              | 16       |
| 2.5.3 Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA).....                | 17       |
| 2.6 Kozmetik Sanayiinde Kullanılan Nanotaşıyıcı Sistemler..... | 18       |
| 2.6.1 Veziküler Taşıyıcı Sistemler.....                        | 18       |
| 2.6.2 Nanoemülsiyonlar.....                                    | 19       |
| 2.6.3 Katı Lipid Nanopartiküller.....                          | 19       |
| 2.6.4 Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar.....                        | 20       |

|          |                                                                  |           |
|----------|------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.7      | Topikal Formülasyonlar .....                                     | 21        |
| 2.7.1    | Merhemler.....                                                   | 21        |
| 2.7.2    | Jeller.....                                                      | 22        |
| 2.7.3    | Hidrojeller.....                                                 | 22        |
| 2.7.4    | Emüljeller.....                                                  | 22        |
| 2.7.5    | Losyonlar.....                                                   | 23        |
| 2.7.6    | Kremler.....                                                     | 23        |
| 2.7.7    | Anti Aging Kremler.....                                          | 25        |
| 2.8      | Bitkisel Kozmetikler .....                                       | 27        |
| 2.8.1    | Glycyrrhiza glabra L.....                                        | 28        |
| 2.8.2    | Glisirizik Asit (GA).....                                        | 31        |
| 2.9      | <i>In Silico</i> Yöntemler .....                                 | 32        |
| 2.9.1    | Moleküler Kenetlenme.....                                        | 32        |
| 2.9.2    | Moleküler Dinamik (MD) Simülasyon Analizleri.....                | 33        |
| 2.9.3    | Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım ve Toksisite (ADMET)..... | 34        |
| <b>3</b> | <b>MATERYAL VE METOT</b> .....                                   | <b>37</b> |
| 3.1      | Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar .....    | 37        |
| 3.1.1    | Malzemeler.....                                                  | 37        |
| 3.1.2    | Cihazlar.....                                                    | 38        |
| 3.2      | Yöntem .....                                                     | 38        |
| 3.2.1    | GA Analitik Metot Geliştirme Çalışması.....                      | 38        |
| 3.2.2    | GA Analitik Validasyon Çalışması.....                            | 38        |
| 3.2.3    | Nanopartiküllerin Hazırlanması.....                              | 40        |
| 3.2.4    | GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun Karakterizasyonu.....          | 41        |
| 3.2.5    | Genotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi.....                    | 43        |
| 3.2.6    | Hücre Kültürü Çalışmaları.....                                   | 43        |
| 3.2.7    | <i>In Silico</i> Analizleri.....                                 | 45        |
| 3.2.8    | Nihai Formülasyon Çalışmaları.....                               | 47        |
| 3.2.9    | Stabilite Çalışmaları.....                                       | 50        |



|                                                                                                |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4 DENEY SONUÇLARI</b>                                                                       | <b>51</b>  |
| 4.1 GA Analitik Validasyon Çalışmaları.....                                                    | 51         |
| 4.2 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun Karakterizasyon Sonuçları ...                            | 54         |
| 4.2.1 DLS Analizi.....                                                                         | 54         |
| 4.2.2 SEM Analiz Sonuçları.....                                                                | 56         |
| 4.2.3 Enkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması.                              | 57         |
| 4.2.4 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun In Vitro Salım Analizi<br>Sonuçları.....               | 57         |
| 4.3 Genotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi .....                                             | 58         |
| 4.4 Sitotoksitenin Belirlenmesi.....                                                           | 59         |
| 4.5 In silico çalışmalar.....                                                                  | 61         |
| 4.5.1 Moleküler Kenetlenme Çalışmaları.....                                                    | 61         |
| 4.5.2 Moleküler Dinamik Analizleri.....                                                        | 65         |
| 4.5.3 Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım ve Toksisite (ADMET)<br>Çalışması .....           | 71         |
| 4.6 Nihai Formülasyon Çalışmaları .....                                                        | 74         |
| 4.6.1 Plasebo Kremlerin Fiziksel Analiz Sonuçları.....                                         | 74         |
| 4.6.2 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonu İçeren Formülasyonların<br>Fiziksel Analiz Sonuçları..... | 75         |
| 4.7 Stabilité Çalışmaları.....                                                                 | 77         |
| <b>5 SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                                     | <b>82</b>  |
| <b>KAYNAKÇA</b>                                                                                | <b>93</b>  |
| <b>TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR</b>                                                               | <b>107</b> |

## SİMGE LİSTESİ

---

|                 |                         |
|-----------------|-------------------------|
| ±               | Artı-eksi               |
| >               | Büyüktür                |
| KX              | Büyütme oranı           |
| rpm             | Dakikadaki Devir Sayısı |
| $\lambda$       | Dalga Boyu              |
| °C              | Derece Celsius          |
| g               | Gram                    |
| He-Ne           | Helyum-Neon             |
| CO <sub>2</sub> | Karbondioksit           |
| kV              | Kilovolt                |
| <               | Küçüktür                |
| MV              | Megavolt                |
| Mg              | Mikrogram               |
| $\mu$ L         | Mikrolitre              |
| $\mu$ m         | Mikrometre              |
| mg              | Miligram                |
| mL              | Mililitre               |
| mm              | Milimetre               |
| mV              | Milivolt                |
| nm              | Nanometre               |
| KCl             | Potasyum klorür         |
| NaCl            | Sodyum klorür           |
| %               | Yüzde                   |

## KISALTMA LİSTESİ

---

|       |                                                           |
|-------|-----------------------------------------------------------|
| ABD   | Amerika Birleşik Devletleri                               |
| ADMET | Emilim, dağılım, metabolizma, boşaltım ve toksisite       |
| CF    | Güven aralığı                                             |
| CYP   | Sitokrom P450                                             |
| DCM   | Diklorometan                                              |
| DILI  | İlaca bağlı karaciğer hasarı                              |
| DLS   | Dinamik ışık saçılması                                    |
| DMEM  | Dulbecco's Modified Eagle's Medium                        |
| DMSO  | Dimetil sülfoksit                                         |
| DNA   | Deoksiribo Nükleik Asit                                   |
| ECM   | Hücre dışı matris                                         |
| EDTA  | Etilendiamin tetraasetik asit                             |
| FBS   | Fetal Bovine Serum                                        |
| FDA   | Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi                   |
| GA    | Glisirizik asit                                           |
| HaCaT | İnsan epidermal deri hücreleri                            |
| ISO   | Uluslararası Standartlar Organizasyonu                    |
| MD    | Moleküler Dinamik                                         |
| MGA   | Minimal glukoz agar                                       |
| MMP   | Matriks metalloproteinaz                                  |
| MTT   | 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür |
| NPD   | 4-Nitro-o-fenilendiamin                                   |
| PBS   | Fosfat Tamponu                                            |
| PdI   | Polidispersite İndeksi                                    |
| PLGA  | Poli(laktik-ko-glikolik asit)                             |
| PVA   | Polivinil alkol                                           |
| RMSD  | Kök-ortalama-kare sapma                                   |
| RMSF  | Kök ortalama kare dalgalanması                            |
| ROS   | Reaktif oksijen türleri                                   |

|        |                                   |
|--------|-----------------------------------|
| RSD    | Relatif Standart Sapma            |
| SA     | Sodyum azid                       |
| SC     | Stratum Corneum (Korneum Katmanı) |
| SEM    | Taramalı Elektron Mikroskobu      |
| TPP    | Tripolifosfat                     |
| UV     | Ultraviyole                       |
| UVR    | Ultraviyole radyasyon             |
| UV-Vis | Ultraviyole-Görünür Bölge         |
| Z-Ave  | Ortalama partikül boyutu          |
| ZP     | Zeta potansiyeli                  |



## ŞEKİL LİSTESİ

|            |                                                                                                                                                                      |    |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1  | Epidermisin yapısı.....                                                                                                                                              | 6  |
| Şekil 2.2  | UVR ışınları ve izledikleri yol .....                                                                                                                                | 10 |
| Şekil 2.3  | Pandemi sürecinde kadınların kişisel bakım ürünlerine ait<br>harcamalarının karşılaştırılması.....                                                                   | 12 |
| Şekil 2.4  | Pandemi sürecinde kadınların kişisel bakım ürünlerine ait en sık<br>yaptıkları harcamaların karşılaştırılması .....                                                  | 13 |
| Şekil 2.5  | 2021-2027 yılları arasında beklenen doğal kozmetik ve kişisel bakım<br>için küresel pazar değeri trendleri.....                                                      | 14 |
| Şekil 2.6  | GA molekül yapısı .....                                                                                                                                              | 31 |
| Şekil 2.7  | Moleküler kenetlenme hesaplamalarının genel akışı .....                                                                                                              | 33 |
| Şekil 3.1  | GA yüklü PLGA nanoformülasyonu <i>in vitro</i> salım çalışması.....                                                                                                  | 42 |
| Şekil 3.2  | Faz A ve Faz B'nin homojenizasyon işlemi.....                                                                                                                        | 48 |
| Şekil 3.3  | Numunelerin stabiliteye alınma şekilleri.....                                                                                                                        | 50 |
| Şekil 4.1  | GA kalibrasyon eğrisi.....                                                                                                                                           | 52 |
| Şekil 4.2  | a) Boş PLGA ve b) GA yüklü PLGA nanoformülasyonuna ait Z-Ave ve<br>PdI sonuçları.....                                                                                | 55 |
| Şekil 4.3  | a) Boş PLGA ve b) GA yüklü PLGA nanoformülasyonuna ait ZP<br>sonuçları.....                                                                                          | 56 |
| Şekil 4.4  | GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun SEM görüntüsü (a) GA yüklü<br>PLGA nanoformülasyonuna genel bakış (b) İşaretli GA yüklü PLGA<br>nanoformülasyonunun boyutları..... | 57 |
| Şekil 4.5  | GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun <i>in vitro</i> salım grafiği.....                                                                                                 | 58 |
| Şekil 4.6  | HaCaT hücre hattında GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun hücre<br>canlılığı analizi.....                                                                               | 60 |
| Şekil 4.7  | HaCaT hücre hattında GA'in hücre canlılığı analizi.....                                                                                                              | 60 |
| Şekil 4.8  | GA'in moleküler kenetlenme sonuçları.....                                                                                                                            | 63 |
| Şekil 4.9  | GA'in etkileşimleri.....                                                                                                                                             | 64 |
| Şekil 4.10 | a) MMP-1(PDB ID: 966C), b) MMP-3(PDB ID: 2JT6), c) MMP-9(PDB<br>ID: 5CUH) ile GA komplekslerinin MD sistem yapıları.....                                             | 66 |
| Şekil 4.11 | MMP-1 (PDB ID: 966C) ile kompleks halinde GA'in MD simülasyon<br>analizi.....                                                                                        | 67 |

|                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.12 MMP-3 (PDB ID: 2JT6) ile kompleks halinde GA'nın MD simülasyon analizi..... | 69 |
| Şekil 4.13 MMP-9 (PDB ID: 5CUH) ile kompleks halinde GA'nın MD simülasyon analizi..... | 70 |
| Şekil 4.14 Plasebo kremlerin sürülebilirlik testi.....                                 | 74 |
| Şekil 4.15 Plasebo kremlerin faz ayrımı kontrolü.....                                  | 75 |
| Şekil 4.16 Nihai formülasyonların faz ayrımı kontrolü .....                            | 76 |
| Şekil 4.17 15.gün numunelerinin görünüşleri.....                                       | 77 |
| Şekil 4.18 1.ay numunelerinin görünüşleri.....                                         | 77 |
| Şekil 4.19 3.ay numunelerinin görünüşleri.....                                         | 77 |
| Şekil 4.20 15.gün numunelerinin faz ayrımı kontrolü .....                              | 78 |
| Şekil 4.21 1.ay numunelerinin faz ayrımı kontrolü .....                                | 78 |
| Şekil 4.22 3.ay numunelerinin faz ayrımı kontrolü .....                                | 78 |

## TABLO LİSTESİ

|                   |                                                                                                                               |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1</b>  | Nanotaşıyıcı sistemler içeren kozmetik ürünlere örnekler.....                                                                 | 21 |
| <b>Tablo 2.2</b>  | Formülasyon çalışmalarında kullanılan hammaddeler ve özellikleri...                                                           | 24 |
| <b>Tablo 2.3</b>  | Anti aging ürünlere ait pazar araştırması.....                                                                                | 25 |
| <b>Tablo 2.4</b>  | Piyasada bulunan anti aging kremlere örnekler.....                                                                            | 26 |
| <b>Tablo 2.5</b>  | Anti aging ürünlerin yapısında bulunan yaygın bitkisel içerikler ve cilde yararları.....                                      | 28 |
| <b>Tablo 2.6</b>  | <i>Glycyrrhiza glabra L.</i> ' nin bildirilen farmakolojik aktiviteleri.....                                                  | 29 |
| <b>Tablo 2.7</b>  | <i>Glycyrrhiza glabra L.</i> içeren farmasötik müstahzarlar.....                                                              | 30 |
| <b>Tablo 3.1</b>  | Deneyler kapsamında kullanılan malzemeler.....                                                                                | 37 |
| <b>Tablo 3.2</b>  | Deneyler kapsamında kullanılan cihazlar.....                                                                                  | 38 |
| <b>Tablo 3.3</b>  | Formülasyonda kullanılan hammaddeler ve fonksiyonları.....                                                                    | 47 |
| <b>Tablo 3.4</b>  | Nihai formülasyonlara ait seri formüller .....                                                                                | 49 |
| <b>Tablo 4.1</b>  | GA' in 190-500 nm aralığında UV spektrumu.....                                                                                | 51 |
| <b>Tablo 4.2</b>  | Boş PLGA çözeltisinin 190-500 nm aralığında UV spektrumu.....                                                                 | 51 |
| <b>Tablo 4.3</b>  | PBS 'in 190-500 nm aralığında UV spektrumu.....                                                                               | 52 |
| <b>Tablo 4.4</b>  | Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması.....                                                          | 53 |
| <b>Tablo 4.5</b>  | Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları.....                                                                               | 53 |
| <b>Tablo 4.6</b>  | Geri kazanım çalışması sonuçları.....                                                                                         | 54 |
| <b>Tablo 4.7</b>  | Zamana bağlı absorbans değişimi.....                                                                                          | 54 |
| <b>Tablo 4.8</b>  | Z-Ave ve PDI ölçüm sonuçları.....                                                                                             | 55 |
| <b>Tablo 4.9</b>  | ZP ölçüm sonuçları.....                                                                                                       | 56 |
| <b>Tablo 4.10</b> | GA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun <i>S.typhimurium</i> TA98 ve TA100 mutant suşları üzerindeki genotoksik etkileri..... | 59 |
| <b>Tablo 4.11</b> | GA ve MMP hedefleri arasındaki kenetlenme enerjileri ve olası etkileşimler.....                                               | 61 |
| <b>Tablo 4.12</b> | Molinspiration ve SwissADME sunucuları tarafından ilaca benzerliğini gösteren GA sanal taraması.....                          | 71 |
| <b>Tablo 4.13</b> | pkCSM sunucusu tarafından ADME ve toksisiteyi gösteren GA'in farmakokinetik özellikleri.....                                  | 72 |
| <b>Tablo 4.14</b> | ProTox-II -GA için oral toksisite tahmin sonuçları.....                                                                       | 73 |
| <b>Tablo 4.15</b> | Plasebo kremlerin fizikokimyasal karakterizasyon analiz sonuçları...                                                          | 74 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 4.16</b> Nihai formülasyonların fiziksel analiz sonuçları ..... | 75 |
| <b>Tablo 4.17</b> Viskozite ölçüm sonuçları.....                         | 76 |
| <b>Tablo 4.18</b> 15.gün viskozite ölçüm sonuçları.....                  | 79 |
| <b>Tablo 4.19</b> 1.ay viskozite ölçüm sonuçları.....                    | 79 |
| <b>Tablo 4.20</b> 3.ay viskozite ölçüm sonuçları.....                    | 80 |
| <b>Tablo 4.21</b> 15.gün pH ölçüm sonuçları.....                         | 80 |
| <b>Tablo 4.22</b> 1.ay pH ölçüm sonuçları.....                           | 81 |
| <b>Tablo 4.23</b> 3.ay pH ölçüm sonuçları.....                           | 81 |





# Bitkisel İçerikli Yaşlanma Karşıtı Nanoformülasyon Geliştirilmesi

Çiğdem ÇETİN ALUÇ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Ultraviyole (UV) ışınlar, cilt yaşlanmasında önemli rol oynayan harici yaşlanmanın en önemli nedenidir ve fotoyaşlanma olarak tanımlanmaktadır. Fotoyaşlanma, ciltte elastikiyet kaybına ve kırışık oluşumuna sebep olmaktadır.

Kozmetik pazarında, her geçen gün artan ürün sayısı ile anti aging kremler; cilde toparlayıcı etkide bulunarak ciltteki kırışıklık ve çizgi görünümünün azalmasına ve pürüzsüz bir cilt yüzeyi oluşmasına destek sağlamaktadır.

Kozmetik uygulamalarda aktif maddelerin taşınımının ve penetrasyonunun iyileştirilmesi, oksidasyona karşı korunması amacıyla nano boyutlarda formülize edilerek kullanılması stratejisi günümüzde birçok ticari marka için yatırım konusu olmuştur.

Glisirizik asit (GA), meyan kökünün (*Glycyrrhiza glabra* L.) ana bileşenlerinden biridir ve çeşitli terapötik özellikleri ile tıbbi bir bitki olarak kullanılmaktadır. GA tuzları ve esterleri, çeşitli cilt bakım ürünlerinde kullanımı olan kozmetik bileşenlerdir. GA ayrıca insan dermal fibroblastlarında UV kaynaklı fotoyaşlanmaya karşı inhibe edici etkisi bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı, topikal uygulama için GA içeren anti aging bir nanoformülasyon geliştirmektir. Bu kapsamda, GA yüklü Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) nanoformülasyonu çift emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmış, çeşitli spektroskopik ve görüntüleme yöntemleri ile karakterize edilmiştir.

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun enkapsülasyon verimi, yükleme kapasitesi, *in vitro* salım profili belirlenmiş, genotoksitesitesi Ames testi ile, sitotoksitesitesi ise 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, GA'in HaCaT hücrelerinde UVB kaynaklı foto yaşlanmayı önlemedeki etkinliği ve GA'in Matriks metalloproteinazlara (MMP'lara) bağlanmasının moleküler mekanizmasının netleştirilmesi için *in silico* analizleri gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen GA yüklü PLGA nanoformülasyonu ile krem formülasyonları hazırlanmış, organoleptik kontroller ve fiziksel testler yapılmıştır. Ardından krem formülasyonları  $5 \pm 3$  °C,  $25 \pm 2$  °C % 60 RH,  $40 \pm 2$  °C % 75 RH olmak üzere üç farklı ortam koşulunda stabilite kabinlerine alınarak 15.gün, 1.ay ve 3.ay periyotlarında aynı kontroller ve testler tekrarlanarak, formülasyonların başlangıç durumları ile karşılaştırılarak tamamlanmıştır.

Elde edilen *in vitro* ve *in silico* sonuçlar değerlendirilmiş ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonun anti aging özellikli cilt bakım ürün adayı olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Glisirizik asit, kontrollü salım sistemi, *in vitro* hücre kültürü, moleküler docking, yaşlanma karşıtı.

# Development of Herbal Nanoformulation for Anti-aging Application

Çiğdem ÇETİN ALUÇ

Department of Bioengineering

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ

Ultraviolet (UV) rays are the most important cause of extrinsic aging that plays an important role in skin aging and is defined as photoaging. Photoaging causes loss of elasticity and wrinkle formation in the skin.

In the cosmetics market, with the increasing number of products, anti aging creams; it helps to reduce the appearance of wrinkles and lines on the skin and to form a smooth skin surface by having a regenerative effect on the skin.

The strategy of using nano-sized formulations to improve the transport and penetration of active substances in cosmetic applications and to protect them against oxidation has been the subject of investment for many trademarks today.

Glycyrrhizic acid (GA) is one of the main components of licorice root (*Glycyrrhiza glabra L.*) and is used as a medicinal plant with various therapeutic properties. GA salts and esters are cosmetic ingredients that have uses in a variety of skin care products. GA also has an inhibitory effect against UV-induced photoaging in human dermal fibroblasts.

The aim of this thesis study is to develop an anti-aging nanoformulation containing GA for topical application. In this context, GA-loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoformulation was prepared using the double emulsion method and characterized by various spectroscopic and imaging methods.

The encapsulation efficiency, loading capacity and in vitro release profile of the GA-loaded PLGA nanoformulation were determined, its genotoxicity was evaluated with the Ames test, and its cytotoxicity was evaluated with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test.

In addition, *in silico* analyzes were performed to clarify the efficacy of GA in preventing UVB-induced photoaging in HaCaT cells and the molecular mechanism of GA binding to Matrix metalloproteinases (MMPs).

Cream formulations were prepared with the obtained GA-loaded PLGA nanoformulation, organoleptic controls and physical tests were performed. Then, the cream formulations were taken into stability cabinets at three different ambient conditions,  $5 \pm 3$  °C,  $25 \pm 2$  °C 60% RH,  $40 \pm 2$  °C 75% RH, and the same controls and tests were performed at the 15th day, 1st month and 3rd month periods. The tests were completed by repeating and comparing the initial conditions of the formulations.

The obtained in vitro and in silico results were evaluated and it was concluded that GA-loaded PLGA nanoformulation could be used as a skin care product candidate with anti-aging properties.

**Keywords:** Glycyrrhizic acid, controlled release system, *in vitro* cell culture, molecular docking, anti aging.

### 1.1 Literatür Özeti

Günümüzde, kişisel bakım sektörünün önemli bir parçasını oluşturan kozmetik ürünler; cilt ve saç bakım ürünleri, makyaj malzemeleri ve anti aging etkili ürünleri içeren geniş bir ürün yelpazesine sahiptir. Kozmetik ürünler, cildi ve saç koruma, nemlendirme, besleme ve hoş bir koku verme amaçlarıyla tüketiciye sunulmaktadır (İstanbulluoğlu, Timur et al., 2019).

Kozmetik ürünlerde aktif bileşen, sürekli etki ve geçimsiz bileşenlerin formülasyonuna olanak sağlama, stabilite ve derinin penetrasyonunu artırma amaçlarıyla çözelti, jel, emülsiyon, süspansiyon, toz preparatlar, aerosol gibi taşıyıcı bir sistem içerisinde formüle edilebilmektedir. Bitkisel kökenli bileşenler, antioksidanlar, peptitler ve büyüme faktörleri taşıyıcı sistemler içinde uygulanabilmektedir (Yapar and Tanrıverdi, 2016).

Son yıllarda güzellik ve estetik alanında artan tüketici taleplerine paralel olarak, kozmetik ürünlerde nanoteknolojinin performans artırma amaçlı kullanımı artış göstermektedir. Nanoteknolojik yöntemler ile geliştirilen formülasyonlar, boyutlarının oldukça küçük olmasından dolayı deriye derinlemesine nüfuz edebilmektedirler. Bu özellikleri kullanım amaçlarına ve kullanılan etkin maddenin türüne göre avantaj sağlamaktadır. Katı polimerik nanopartiküller, lipit nanopartiküller ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar kozmetik ürünlerde kullanılabilen gelişmiş taşıyıcı sistemlerdir (Zhang, Gao et al., 2010).

Polimerler, nispeten küçük boyut ve stabilite avantajına sahiptirler. Aktif bileşiklerin deri içine taşınmasında kullanımının araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Polimerik nanopartiküller optimize edilebilmelerinden dolayı ilaç dağıtımı için optimal taşıyıcılardır. *In vitro* ve *in vivo* uygulamalara uygun hale getirmek için polimerlerin boyut, yüzey doğası ve türleri gibi fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin incelendiği sentetik yöntemler mevcuttur (Mir, Ahmed et al., 2017).

Nanoteknoloji, 1980'lerin başından beri immün sistemle ilişkili cilt hastalıklarının topikal tedavisinde kullanılmaktadır. Deri bariyerlerine yüksek afinite ve lipofilik ilaçların yüklenmesindeki iyi uyumluluk nedeniyle, ilaç penetrasyonunu ve terapötik etkinliği iyileştirmek veya aktif ajanların toksisitesini azaltmak için lipit bazlı ve polimerik nanopartiküller geliştirilmiştir (Sun, Liu et al., 2017).

Cilt yaşlanması, çeşitli faktörler sonucu oluşan biyolojik bir süreçtir. Bu faktörlerden UV ışığına bağlı olan fotoyaşlanmanın ciltteki kırıxıklığın ana sebeplerinden biri olduğu düşünölmektedir. Fotoyaşlanma sonucu ciltte, düzensiz pigmentasyon, elastikiyet kaybı, artan pürüzlölük, kırıxıklık ve kuruluk meydana gelmektedir (Yapar, Tanrıverdi, 2016). Cilt bakımı, cildin yenilenmesini, elastikiyetini, pürüzsüzlüğünü artırabilir ve böylece cilt durumunu geçici olarak değıştirebilir. Bununla birlikte, kırıxıklık oluşumunu önlemek için kolajen, elastin gibi cildin birincil yapısal bileşenlerinin bozulmasını durdurmak gerekmektedir.

Fotoyaşlanmanın ve kronolojik yaşlanmanın dermal ve epidermal belirtilerini tersine çevirmeye çalışan cilt yaşlanma karşıtı stratejiler mevcuttur. Cildin kronik olarak fotoyaşlanması, kendisini dışsal cilt yaşlanması (fotoyaşlanma) olarak göstermektedir. Deoksiribo Nökleik Asit (DNA) fotohasarı ve UV kaynaklı reaktif oksijen türleri (ROS), cildin kronik fotohasarının tipik histolojik ve klinik belirtilerinin çoğuna yol açan ilk moleküler olaylardır. Kırıxıklık ve pigment değışiklikleri doğrudan erken yaşlanma ile ilişkilidir ve en önemli belirtiler olarak kabul edilmektedir. Foto yaşlanmayı önlemeyi amaçlayan stratejiler arasında güneşten kaçınma, kolajenaz sentezini engellemek ve kolajen üretimini teşvik etmek için cildin UV radyasyon retinoidlerine maruz kalmasını engellemek veya azaltmak için güneş kremleri kullanarak güneşten korunmak, antioksidanlar, anti-aging formölasyonlar yer almaktadır (Ganceviciene, Liakou et al., 2012).

## **1.2 Tezin Amacı**

Bu doktora tez çalışmasında GA yüklö PLGA nanoformölasyon hazırlanması, hazırlanan nanoformölasyonun disperse edildiğı anti-aging özellik gösteren krem formölasyonunun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

### 1.3 Hipotez

Bitkisel içerikli kozmetik ürünler, sentetik kozmetik ürünlere göre daha az yan etkiye sahip olmaları sebebiyle tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Bitkiler; antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivitelerine ek olarak güçlü antioksidan özellik göstererek; kozmetikte esas olarak ürün kalitesini artırmak ve işlevselliği iyileştirmek için kullanılmaktadırlar. Bitkilerin düşük biyoyararlanımını ise nanoteknolojik uygulamalar vasıtasıyla arttırmak mümkündür.

Kozmetik formülasyonların geliştirilmesinde konvansiyonel üretim yöntemlerine kıyasla nanoteknolojik üretim yöntemleri; aktif maddenin taşınım kolaylığı, cilt penetrasyonunun iyileştirilmesi ve aktif bileşiklerin oksidasyona karşı korunması gibi avantajları ile yaygın olarak tercih edilmektedir.

Eski çağlardan beri kullanılan, çeşitli aktiviteleri raporlanmış olan GA cilt bakım ürünlerinde kullanımı olan kozmetik bir bileşendir. Literatürde raporlanan bir önemli aktivitesi ise insan dermal fibroblastlarında UVB kaynaklı fotoyaşlanmaya karşı inhibe edici etki göstermesidir.

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, anti aging özelliğe sahip GA yüklü PLGA nanoformülasyonu ihtiva eden bir formülasyon geliştirilmediği görülmüştür.

Bu doktora tez çalışması kapsamında geliştirilen, anti aging özelliğe sahip GA kullanılarak hazırlanan GA yüklü PLGA nanoformülasyonunu içeren krem formülasyonun fotoyaşlanmaya karşı alternatif bir günlük bakım ürünü olacağı ön görülmektedir.

### 2.1 Deri ve Görevleri

Deri, vücut kütlelerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Yetişkinlerde 2 m<sup>2</sup> yüzey alanı ve 3.6 kg ağırlığı ile insan vücudunun en geniş organıdır ve hayati önem taşıyan çeşitli görevlere sahiptir (Gilaberte, Prieto-Torres et al., 2016; Woo, 2019).

Deri, vücut ve çevre arasında bir arayüz görevi görerek; altta yer alan dokuları ve iç organları korur, dış uyaranlara tepki vererek tehlike ve yaralanmalardan kaçınmayı sağlar. Fiziksel bir bariyer görevi görerek, vücudumuzu UV hasarından, kimyasal ve mekanik saldırılardan korur.

Deri, terleme ve izolasyon yoluyla elde edilen vücut ısısının düzenlenmesine katkıda bulunur, su ve elektrolit dengesinin korunmasına yardımcı olur (Niehues, Bouwstra et al., 2018; Woo, 2019).

Deri, vücudu enfeksiyonlardan koruyan sitokinler de dahil olmak üzere, bağışıklığı yeterli hücreler ve çözünür biyolojik yanıt düzenleyiciler ile bol miktarda bulunan aktif bir bağışıklık organıdır (Hwa, Bauer et al., 2011; Eyerich, Eyerich et al., 2018).

Aynı zamanda deri; dokunma, termal ve ağrı sensörleri ile beyni yakın çevredeki değişikliklerden haberdar eden bir duyu organıdır (Silvera-Tawil, Rye et al., 2015; Fenner and Clark, 2016).

### 2.2 Derinin Yapısı

Deri, yüzeyden içeriye doğru; epidermis, dermis ve hipodermis olarak adlandırılan üç katmandan oluşmaktadır (Sahle, Gebre-Mariam et al., 2015). Bu katmanlara ek olarak, deri boyunca birkaç pilosebace ünite ve ter bezleri de yer almaktadır. Epidermisin hemen altında epidermisi destekleyen bazal membran bulunmaktadır.

Dermiste saç kökleri, sinir uçları, kılcal damarlar ve lenf damarları ile yağ bezleri ve ter bezleri gibi cilt ekleri bulunmaktadır.



Kıl folikülleri ve ter kanalları doğrudan cilt yüzeyinde çevreye açılır ve topikal ilaç dağıtımı için çok önemli olan ek deri geçirgenliği yolunu sağlar.

Dermisin altında, yalıtım, koruyucu dolgu ve enerji depolaması sağlayan deri altı tabakası bulunmaktadır (Voshavar, Kumar Vemula et al., 2019).

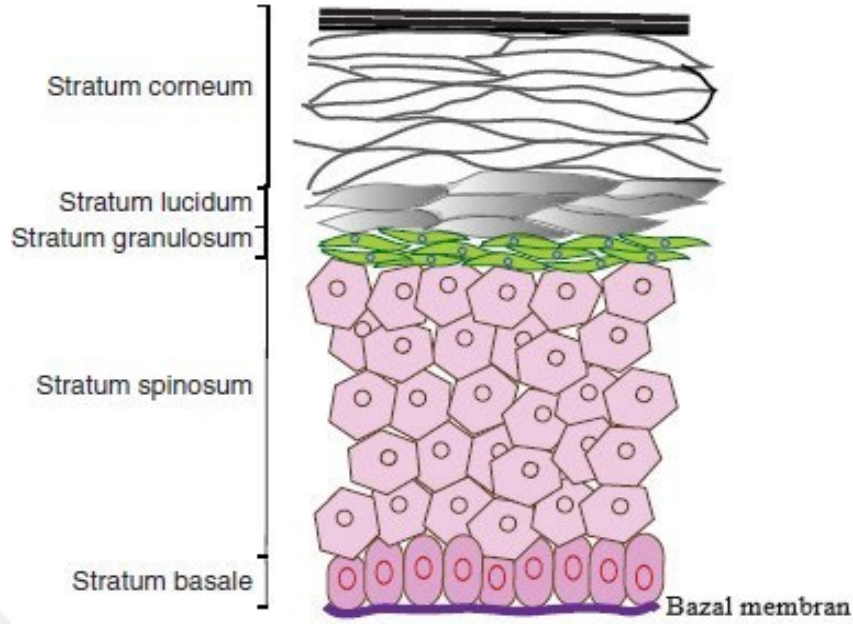
### **2.2.1 Epidermis**

Epidermis, derinin en dış tabakasıdır ve kalınlığı 0.5 mm-1.5 mm arasında değişkenlik göstermektedir. Tabakalı bir skuamöz epitel tabakasından, temel olarak keratinositler ve melanositlerden oluşmaktadır. Bunların yanı sıra, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri gibi bir dizi başka hücre popülasyonunu da barındırmaktadır.

Keratinosit, epidermisin mekanik ve su bariyeri işlevinden sorumluyken, melanositler, Langerhans hücreleri ve Merkel hücreleri sırasıyla cilt pigmentasyonu, bağışıklık koruması ve duyuşal (dokunma) işlevlerinden sorumludur. Epidermis, bazal membran ile dermisten ayrılır (Fenner and Clark, 2016; Lai-Cheong and McGrath, 2017).

İnce derilerde epidermis dört kat epitel katmandan oluşurken, kalın derilerde beş kat epitel katman bulunmaktadır (Şekil 2.1). İnce deride, aşağıdan yukarıya veya derinden yüze doğru, epidermal katmanlar stratum basale (bazal katman), stratum spinosum (spinöz katman veya suprabazal katman), stratum granulosum (granüler katman) ve stratum corneum (boynuzsu katman) olarak sıralanmaktadır.

Kalın deride, stratum granulosum ve stratum corneum arasında ek bir katman olan stratum lucidum (lucidum katmanı) bulunmaktadır (Freeman and Sonthalia, 2019; Woo, 2019).



**Şekil 2.1** Epidermisin yapısı (Woo, 2019)

#### **2.2.1.1 Stratum Basale (Bazal Katman)**

Bazal tabaka, tek bir bazal epidermal hücreler tabakasından oluşmaktadır. Bu hücreler, bazal hücreler veya bazal keratinositler olarak da bilinmektedir. Keratinositlere ek olarak, melanositler ve Merkel hücreleri de bazal tabakada bulunmaktadır.

Bazal tabakada, melanositler hücre popülasyonunun yaklaşık % 3' ünü oluşturmaktadır. Melanositlerde, melanin üretilir ve melanozomlarda paketlenerek, melanosit hücre gövdesinden stratum spinosumdaki keratinositlere uzatılmış dendritler yoluyla taşınmaktadır.

Melanozomlar, keratinositlerin çekirdeğini sararak onları UV ışınlarından korumaktadır (Woo, 2019; Castellano-Pellicena, Morrison et al., 2021).

#### **2.2.1.2 Stratum Spinosum (Dikenli Katman)**

Aynı zamanda suprabazal tabaka olarak da bilinen dikenli tabaka adını lekeli örneklerdeki dikenli görünümünden almaktadır. Dikenli görünüm, keratinositlerini birbirine bağlayan dezmozomlar tarafından üretilen çıkıntı yapılarından gelmektedir.

Dikenli keratinositler, su itici glikolipidleri üretmektedir. Genel olarak, dikenli katman cildin gücüne ve esnekliğine katkıda bulunmaktadır.

Dikenli katman, poligonal şekilli keratinositlerin 8-10 alt katmanından oluşmaktadır. Keratinositlere ek olarak, bu tabakada bulunan Langerhans hücreleri; epidermiste yatay bir düzlem boyunca uzanan yassı dendritlere sahip dendritik hücrelerdir.

Langerhans hücrelerinin hücre gövdesi ve uzatılmış dendritleri, cilt yüzeyinin % 25'ini kaplamaktadır. Langerhans hücreleri, epidermisteki antijenleri ve diğer yabancı maddeleri tanımada ve yakalamada etkilidir (Woo, 2019; Moreci and Lechler, 2020).

#### **2.2.1.3 Stratum Granulosum (Granüler Katman)**

Keratinizasyon granüler katmanda başlar; grenli görünüm, keratinositlerdeki keratinler ve keratohyalin (lameller granüller) tarafından üretilmektedir. Bu keratohyalin granülleri, ~26-48 kDa filaggrinlere (filament toplayıcı proteinler) bölünecek olan ~400–500 kDa'lık bir protein olan profilaggrin'den oluşmaktadır. Profilaggrin bölünmesi, keratinositlerin stratum granulosumdan stratum corneum'a hareket etmesiyle oluşmaktadır.

Enükleasyon, granüler hücreler, stratum corneum'un özel keratinositleri olan korneositlere farklılaştıkça gerçekleşmektedir. Granüler hücrelerde, bariyer işlevine de katkıda bulunan sıkı bağlantılar oluşmaktadır (Freeman and Sonthalia, 2019; Woo, 2019).

#### **2.2.1.4 Stratum Lucidum (Lusidum Katmanı)**

Lusidum katmanı sadece kalın derinin epidermisinde, özellikle avuç içi ve ayak tabanlarında bulunmaktadır. Mikroskopik olarak, pürüzsüz ve görünüşte yarı saydam bir görünüme sahiptir. Keratohyalinden türetilen ve su bariyeri işlevine katkıda bulunan lipid açısından zengin bir protein olan eleiden yapısını içermektedirler (Yousef, Alhajj et al., 2017; Woo, 2019).

#### **2.2.1.5 Stratum Corneum (Korneum Katmanı)**

Korneum katmanı (SC), hücre dışı çok katmanlı lipid matrisine gömülü, korneositler olarak da bilinen çekirdeksiz ölü epidermal hücrelerden oluşmaktadır.

SC lipid bileşimi, neredeyse hiç fosfolipit içermemesi ve lipidlerin büyük bir bölümünün doymuş olması bakımından diğer biyolojik membranların çoğundan farklıdır.

SC'nin ana görevi, vücudu dış materyallerin cilde girişinden korumaktır. Lipofilik bir tabaka olduğu için hidrofilik moleküllerin tabaka boyunca taşınmasına izin vermemektedir. SC'un ayrıca kurumayı önlemek, fiziksel zorlama ve stresten kaynaklanan deformasyonu tolere etmek gibi görevleri de vardır (Gunnarsson, Mojumdar et al., 2021; Darwin, Schleusener et al., 2022).

### **2.2.2 Dermis**

Dermis; epidermisin altında, kolajen, elastik lifler ve ekstrasfibriler matriks ile kan kılcal damarları, lenfatik damarlar ve sinir uçlarından oluşan bir ağdan ve ince ve yüzeysel papiller dermis ve retiküler dermis olmak üzere iki katmandan oluşmaktadır.

Papiller dermis, dermoepidermal bileşkenin altında yer almaktadır ve gevşek şekilde düzenlenmiş kollajen lifleri içermektedir. Retiküler dermis ise cilt yüzeyine paralel uzanan daha kalın kollajen demetlerinden oluşmaktadır.

Dermis, fibroblastlar, fibrositler ve kan ve lenf damarlarının yapısal hücreleri gibi stromal hücreleri, birçok farklı miyeloid ve lenfoid bağışıklık hücresi popülasyonunu içermektedir (Fenner and Clark, 2016; Gilaberte, Prieto-Torres et al., 2016).

### **2.2.3 Hipodermis**

Hipodermis, esas olarak, fibröz bağ dokusu (septa) tarafından tanımlanan lobüller halinde organize edilen adipositler tarafından oluşturulmaktadır. Septa içinde sinirler, kan ve lenf damarları bulunmaktadır. Hipodermis, yedek bir enerji kaynağı görevi görmektedir (Fenner and Clark, 2016; Gilaberte, Prieto-Torres et al., 2016).

### 2.3 Cilt Yaşlanması

Cildimiz, vücudumuzu dış ortamdan ayıran, çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahip karmaşık yapılı bir bariyerdir (Niehues, Bouwstra et al., 2018; Li, Bai et al., 2020). Vücudumuzu patojenik, kimyasal ve fiziksel saldırılara karşı korumasının yanı sıra kozmetik açıdan da önemli bir role sahiptir.

Genç ve güzel görünüm, kişinin sosyal hayatı üzerinde olumlu etkiler sağlarken, yüzdeki cilt yaşlanması, kırışıklık, sarkma, donuk ve kuru cilt gibi belirtileri ile özellikle kadınların en yaygın kozmetik endişelerinden biridir (Zhang, Duan, 2018; Rattanawiwatpong, Wanitphakdeedecha et al., 2020).

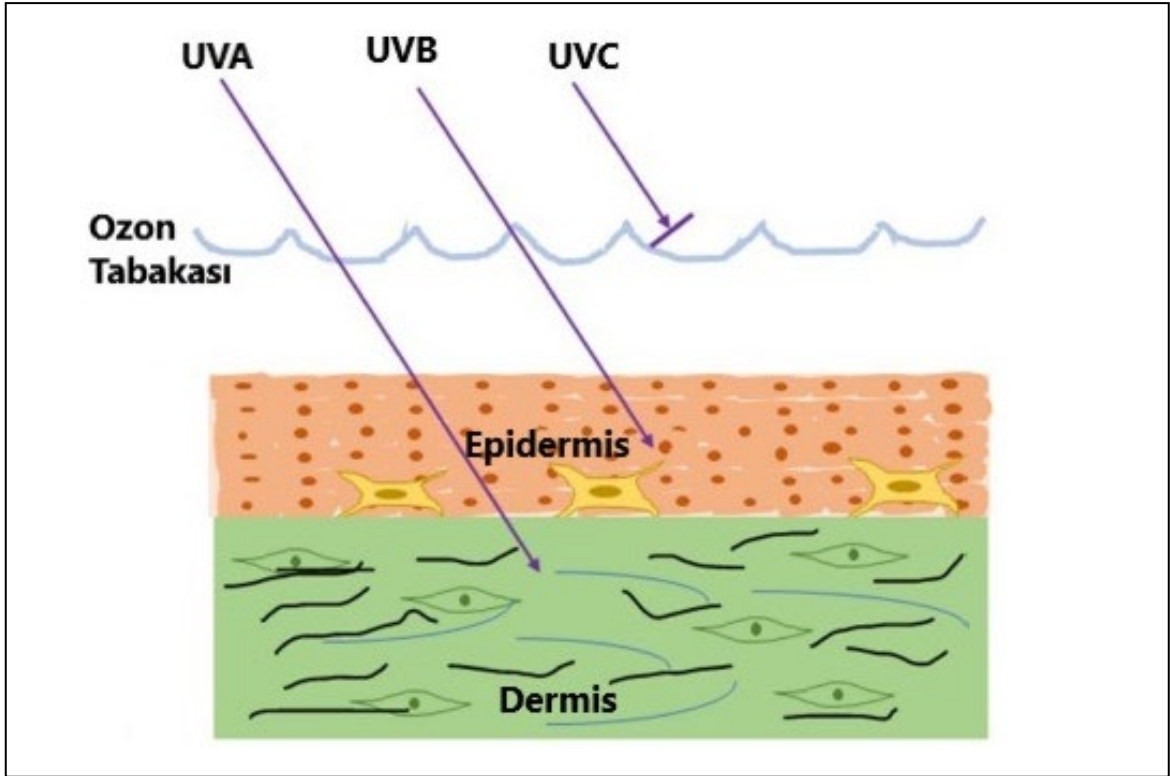
Cilt yaşlanması, elastikiyet ve pigmentasyonun azalması, epidermal kök hücre kaybı dahil olmak üzere genç ciltte bulunan belirli özelliklerin sürekli kaybı olarak tanımlanmaktadır (Panich, Sittithumcharee et al., 2016; Bolke, Schlippe et al., 2019).

Cilt yaşlanması, iç ve dış faktörlerin neden olduğu karmaşık bir biyolojik süreçtir. Dahili yaşlanma, zamanın doğal bir sonucudur ve ince, kuru cilt ve ince kırışıklıklar ile sonuçlanan fizyolojik bir süreçtir. Dış yaşlanma, hava kirliliği, sigara içme, kötü beslenme ve güneşe maruz kalma gibi dış çevre faktörlerine bağlı olarak; kaba kırışıklıklar, elastikiyet kaybı, gevşeklik ve kaba görünüm ile sonuçlanır ve önlenabilir (Keaney, 2016; Bielach-Bazyluk, Zbroch et al., 2021).

Ultraviyole radyasyon (UVR) güneşten ve yapay kaynaklardan yayılarak, cilde ciddi zararlar verebilmektedir. UVR'nin başlıca yapay kaynakları; teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan cıva buharlı lambalar, su soğutmalı lambalar ve hava soğutmalı lambalardır.

UVR'ye daha az dozla kronik olarak maruz kalmak fotoyaşlanma denilen cilt yaşlanmasını hızlandırır. Şekil 2.2'de sunulduğu üzere, güneş ışığından gelen UVR, dalga boylarına göre üç tipte sınıflandırılmaktadır; UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) ve UVC (100-280 nm) (Sample and He, 2017; Lephart, 2018; Strzałka, Zglobicki et al., 2020; Ke and Wang, 2021; O'Connor, Courtney et al., 2021).

Şekil 2.2’de sunulduğu üzere, UVC ışınlarının tamamı ve bir miktar UVB ışınları ozon tabakası tarafından emilmektedir ve cilt üzerinde herhangi bir etkisi yoktur. UVB ışınlarının geri kalanı cilt epidermisine nüfuz edebilmekteyken; UVA ışınları ise dermisi istila ederek, cilt yaşlanmasının yaklaşık % 98’den sorumludur (Napagoda, Malkanthi et al., 2016; Mesa-Arango, Flórez-Muñoz et al., 2017; Lephart, 2018; Ansary, Hossain et al., 2021).



Şekil 2.2 UVR ışınları ve izledikleri yol (Ansary et al., 2021)

### 2.3.1 Fotoyaşlanma

UV ışınları cilt yaşlanmasında önemli rol oynayan dışsal yaşlanmanın en önemli nedenidir. UVB ışınlarına aşırı maruz kalan cilt hücreleri, oksidatif strese neden olan ROS' ni üretmek üzere uyarılır (Chen, Gong et al., 2019).

Oksidatif stres ortamında redoks dengesi bozulur ve vücuttaki proteinler, DNA ve lipidler zarar görür ve bu durum fotoyaşlanmayı tetikler (Averilla, Oh et al., 2019). Fotoyaşlanan ciltte bağ dokusu hasar görür ve hücre dışı matrisin (ECM' in) yapısal bütünlüğünün bozulduğu gözlemlenebilir (Yang, Ngo et al., 2019).

ECM, kolajen ve elastin gibi yapısal proteinleri, cildin elastikiyetini ve nemlendirme kabiliyetini korumaktan sorumludur (Park, Hwang et al., 2018). Bununla birlikte, matriks metalloproteinazların (MMP'ların) yüksek ekspresyonuna atfedilen fotoyaşlanan ciltte ECM kompozisyonunda değişiklikler meydana gelmektedir (Hwang, 2010).

MMP' lar çinko içeren endopeptidazlardır ve hücre dışı matrisin farklı bileşenlerinin bozulmasına aracılık ederler. MMP' lar cildin foto yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynar ve kolajenazlar (MMP-1, -8, -13 ve -18), jelatinazlar (MMP-2 ve MMP-9) ve stromelisinler (MMP-3, -10, -11 ve -19) olmak üzere üç baskın ana gruba ayrılırlar (Krusinska, Hawrysz et al., 2018).

UVB, aşırı ROS üretimini indükleyerek MMP' ların seviyesi üzerinde bir etkiye yol açmaktadır (Krusinska, Hawrysz et al., 2018). MMP' lar cilt foto yaşlanma sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Fotoyaşlanan ciltte MMP' ların yüksek ekspresyonu, MMP' ları UVB radyasyonunun neden olduğu cilt fotoyaşlanmasının ana hedefi haline getiren cilt elastikiyet kaybının ve kırışık oluşumunun başlıca nedenlerinden biridir (Gentile and Garcovich, 2021; Kim, Jang et al., 2022).

MMP' lar UV tarafından uyarılır, yüksek düzeyde ekspresyona neden olarak, kollajenin bozulmasına ve prokollajen sentezinin inhibisyonuna sebep olurlar (Xiao, Yang et al., 2020).

## **2.4 Kozmetikler ve Kozmetik Sanayii**

Kozmetik kullanımına dair ilk kanıtlar eski Mısır dönemine dayanmaktadır (González-Minero and Bravo-Díaz, 2018; Amberg and Fogarassy, 2019; Mohiuddin, 2019).

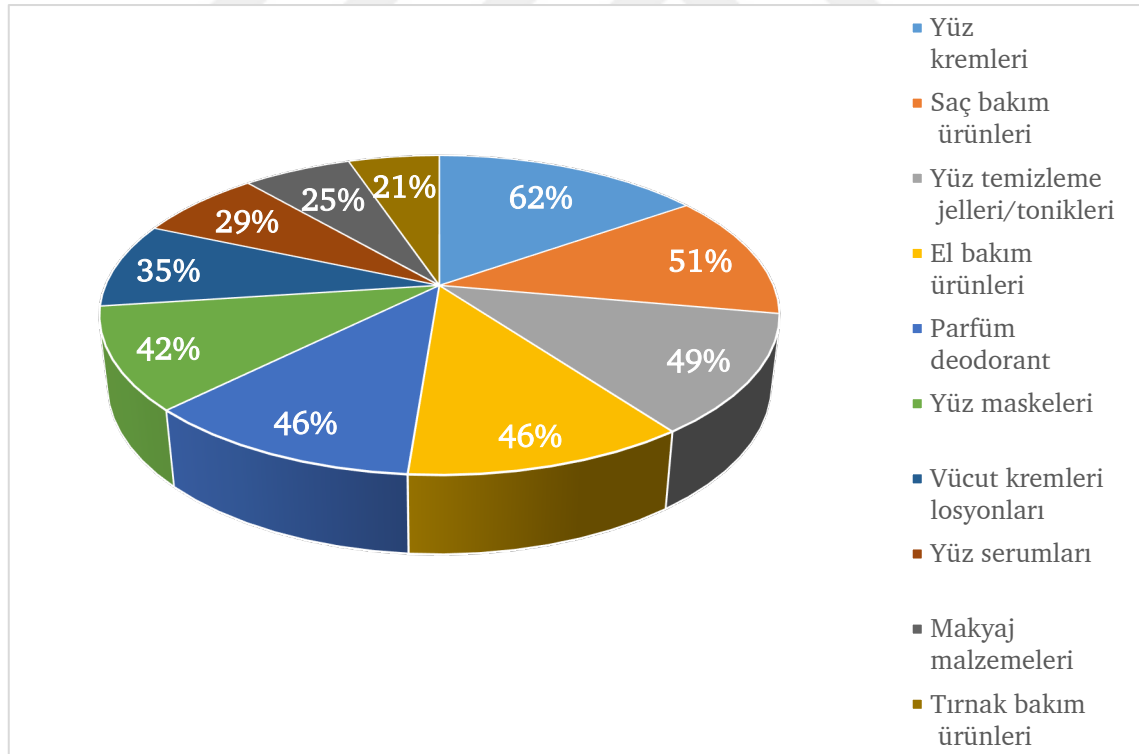
Kozmetikler, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından “insan vücuduna veya herhangi bir kısmına temizlik, güzelleştirme, çekiciliği teşvik etme veya görünümünü değiştirme amaçlı uygulanacak ürünler” olarak tanımlanmaktadırlar (FDA, 2018).

Kozmetik ürünler, insanların görünüşlerini iyileştirmeye yönelik ilgilerinin artmasıyla birlikte, geniş ürün yelpazesi ile tüketicilere hitap ederek, önemli bir pazar payına sahip olan kozmetik sanayii kolunu oluşturmaktadırlar.

Küresel kozmetik pazar büyüklüğü, 2021 yılında 287.94 milyar dolardır ve bu pazarın % 5.0' lik bir Yıllık Bileşik Büyüme Oranı (YBBO) ile 2028 yılına kadar 415.29 milyar dolara ulaşması beklenmektedir.

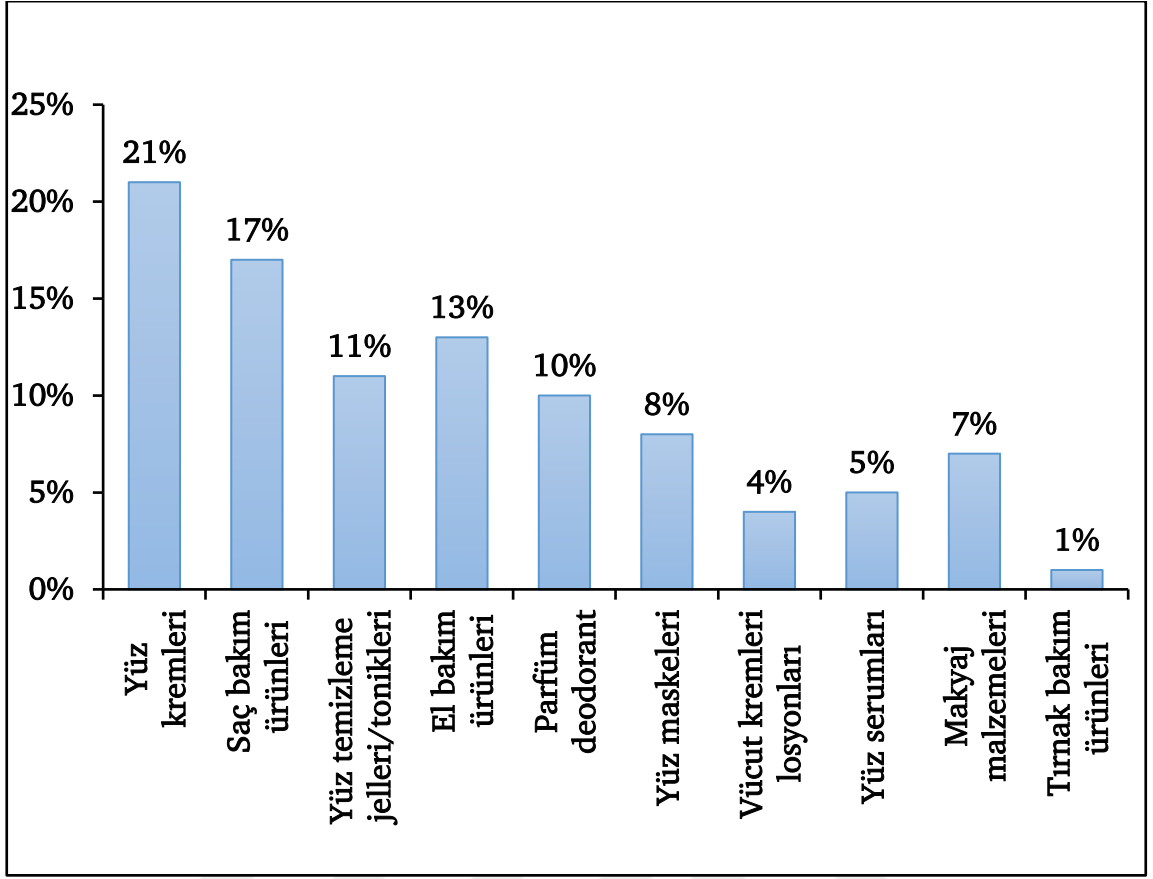
Dünya çapında sağlık bilincine sahip tüketicilerin artmasıyla birlikte, cilt bakımı ürünleri, küresel organik güzellik pazarında en yüksek paya sahip ürün grubunu oluşturmaktadır. Bu grubun global pazar büyüklüğü 2020 yılı için 10.53 milyar dolar olup 2027 yılına kadar % 5' lik bir YBBO ile büyüyeceği tahmin edilmektedir (XSIGHT, 2021).

2021 yılında Türkiye’de, pandemi sürecinde kadınların tüketim alışkanlıklarındaki değişiklikleri gözlemlemek için yapılan bir araştırmaya göre, Şekil 2.3’de sunulduğu üzere yüz bakım kremleri % 62 oranı ile en çok harcama yapılan ürün iken aynı zamanda Şekil 2.4’ de sunulduğu üzere en sık harcama yapılan ürünler arasında da % 21 ile ilk sırada yer almaktadır (Twentify, 2021).



**Şekil 2.3** Pandemi sürecinde kadınların kişisel bakım ürünlerine ait harcamalarının karşılaştırılması

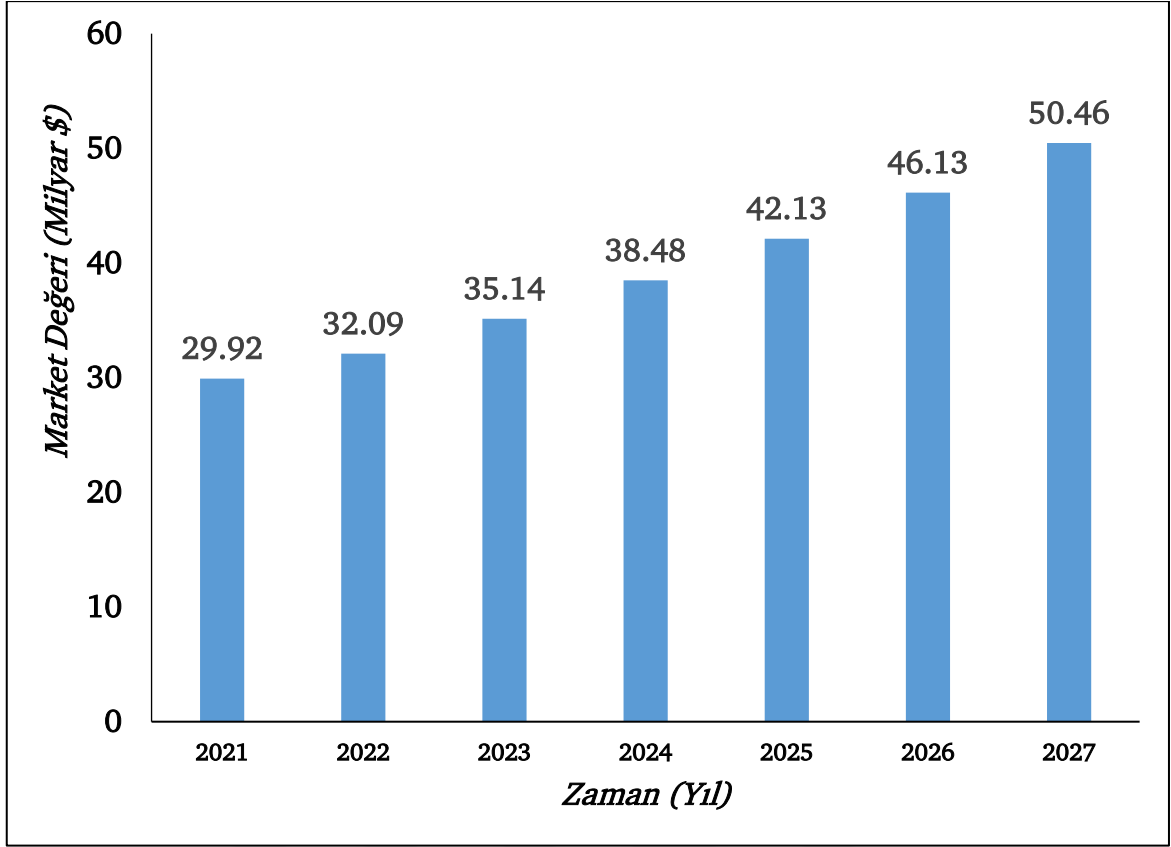




**Şekil 2.4** Pandemi sürecinde kadınların kişisel bakım ürünlerine ait en sık yaptıkları harcamaların karşılaştırılması

Günümüzde tüketiciler, aktif işlemlere sahip doğal içeriklerden yapılan kozmetik ürünleri tercih ederek kozmetik sanayiinde inovasyona yön vermektedirler (Faria-Silva, Ascenso et al., 2020).

Doğal kozmetik ve kişisel bakım için küresel pazar değeri, 2021 yılında 29.2 milyar dolardır ve bu rakamın 2027 yılında 50.46 milyar dolara ulaşması beklenmektedir. Şekil 2.5’ de 2021-2027 yılları arasında sunulmuş olan pazar büyüklüğü trendleri, tüketicilerin doğal ve organik kozmetik pazarına artan talebini gözler önüne sermektedir (Statista, 2022).



**Şekil 2.5** 2021-2027 yılları arasında beklenen doğal kozmetik ve kişisel bakım için küresel pazar değeri trendleri

2021 yılında 32.029,282 milyon ABD Doları değerinde olan dermatolojik terapötik pazarının ise 2027 yılına kadar 53.241,12 milyon ABD Dolarına ulaşması ve bu süreçte % 8.55'lik bir YBBO ile büyümesi beklenmektedir.

Dermatoloji hastalıklarının ilerlemesi, hastalık etiyolojilerine ilişkin farkındalık düzeylerinin ve yaşlı nüfusun artması pazar büyümesini yönlendiren faktörlerden başlıcalarıdır.

Dermatolojik terapötik pazarının büyümesi ile küresel ortaklıklar, şirket satın almaları ve yeni ürün lansmanları gibi faaliyetler de önem kazanmaktadır. 2019 yılında LEO Pharma'nın, Bayer'in reçeteli dermatoloji işletmesini satın alması, 2020 yılında Bayer ve Azitra'nın olumsuz cilt koşullarının ve hastalıklarının tedavisinde potansiyel adayları belirlemek amacıyla Azitra'nın tescilli Staphylococcus epidermidis suşları panelinden yararlanmak için ortak bir geliştirme anlaşması yapması bu faaliyetlerden bazılarıdır (Mordor, 2022).

## 2.5 Kozmetik Ürünlerde Nanoteknolojinin Kullanımı

Nanopartiküller, stabil olmayan ilaçları denatürasyondan etkili bir şekilde koruyabilmelerinin yanı sıra, etken maddenin kontrollü bir şekilde salınımına olanak vererek; uygulanacak dozajın azaltılmasını sağlayarak, yan etkilerin azaltılmasına olanak vermektedirler.

Ayrıca, nanopartiküller sürekli/kontrollü salım ve farklı sınıf ilaçları aynı anda iletme ve yüklenen terapötik bileşeni daha derin dermal katmanlara iletme yeteneklerine sahiptirler. Bu özellikleri nanopartiküllerin taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasında tercih sebepleridir (Voshavar, Kumar Vemula et al., 2019).

Kozmetik üreticileri nanoteknolojiyi kullanarak, ürün niteliklerini geliştirmiş, deriye yeterli nüfuz etme yeteneğine sahip ve kan dolaşımına ulaşımı sınırlanmış, sistemik etkisi olmayan yeni taşıyıcı sistemler geliştirmişlerdir (Arora, Agarwal et al., 2012, Kaptanoğlu, 2013).

Aktif maddenin taşınmanın kolaylaştırılması, daha iyi penetrasyona ve aktif bileşiklerin oksidasyona karşı korunmasına yardımcı olmak amacı ile birçok kozmetik içerik nanopartiküller içerisine yerleştirilmektedir. Metal veya metal oksit nanopartiküller, antibakteriyel, antifungal, fotoprotektif ve hücre rejenerasyonunu arttırmak amaçlı kozmetik ürünlerde sıkça kullanılmaktadır (Hayta and Akyol, 2018).

Nanoteknolojinin, kozmetik ürünlerin performansına çeşitli katkıları mevcuttur. Bu katkılar sıralanacak olursa;

1. Formülasyondaki etken maddenin kontrollü salımı sağlanabilir,
2. Etken maddenin sebep olduğu keskin veya kötü koku kolaylıkla maskelenebilir,
3. Kısa süreli etki yerine daha uzun süre etki sağlanabilir,
4. Etken maddenin iritan özelliği azaltılabilir ve böylece deri toleransı rahatlıkla arttırılabilir.

Nanopartiküller, terapötik molekülleri iletmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal bileşimlerine göre genel olarak iki tipe ayrılır. Birinci tip nanopartiküller, organik malzemelerden (lipitler, proteinler, polimerler) yapılan ve yüzeylerle temas stresiyle şekillerini geçici olarak değiştirebilen lipozomlar, polimer nanopartiküller ve miseller gibi yumuşak partiküllerdir.

İkinci tip nanopartiküller ise, inorganik malzemelerden yapılmış ve deforme olmayan katı parçacıklardır (Voshavar, Kumar Vemula et al., 2019).

### **2.5.1 Polimerik Nanopartiküller**

Nanopartiküllerin küçük partikül boyutları ve yüksek yüzey alanları, diğer hücrelerle etkileşime girmeden, belirli bir hedef dokuyu seçici olarak bağlayabilme özellikleri, nanopartiküllerin ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için kullanımlarının tercih edilmesini sağlamıştır (Locatelli, Comes Franchini, 2012; Khezri, Saeedi et al., 2018).

Biyolojik olarak parçalanabilen polimerik nanopartiküller, yüksek yüzey-hacim oranına sahiptir ve ilaçların biyoaktivitesini değiştirme yeteneği göstermektedirler. Polimerik nanopartiküller, daha iyi ilaç stabilitesi, spesifik hedefleme ve kontrollü salım sağlamaktadırlar (Mota, Sousa et al., 2020). Polimerik nanopartiküller, ilacın polimerik matris içinde kapsüllenmesiyle biyouyumlu ve biyobozunur polimerlerden üretilmektedirler. Polimerik nanopartiküllere yüklenecek etken maddenin türüne ve uygulama yolu için gereksinimlerine bağlı olarak, nanopartikül üretimi için kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur (Zielińska, Carreiró et al., 2020).

### **2.5.2 Çift Emülsiyon Yöntemi**

Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi, polimerik nanopartikül sentezinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, polimerin bir yüzey aktif madde ile suda emülsiyonlaştırılmadan önce uçucu, suyla karışmayan bir çözücü içinde çözülmesi ve ardından çözücünün buharlaştırılması prensibine dayanmaktadır. Hidrofobik ilaçlar için genellikle (yağ/su) tek bir emülsiyon işlemi kullanılırken, hidrofilik ilaçlar için çift emülsiyon (su/yağ/su) yöntemi kullanılmaktadır (Roberts, Smyth et al., 2020).

Çift emülsiyon yöntemi kozmetik, gıda ve diğer alanlarda kullanılan hidrofilik ilaçların kapsüllenmesi için en uygun yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu teknik, iç sulu fazda çözünmüş aktif bileşenlerin kontrollü salınımına izin veren polimerik partiküller hazırlamak için kullanılmaktadır. Bu teknikle geliştirilen partiküllerin en önemli işlevi, enkapsüle edilen aktif maddeyi ışığa, enzimatik bozulmaya ve oksidasyona karşı korumasıdır (Iqbal, Zafar et al., 2015).

### 2.5.3 Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

PLGA, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış iyi bilinen bir kopolimerdir. İşlevselliğindeki çok yönlülüğü, biyouyumlu ve biyobozunur olması PLGA'nın ilaç taşıyıcı sistemlerde tercih edilmesini sağlayan başlıca özellikleridir (Roointan, Kianpour et al., 2018; Ghitman, Biru et al., 2020; Paul, Cho et al., 2022).

Sun ve arkadaşları, kurkumin yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamış ve bu nanopartikülleri Imiquimod ile indüklenen sedef hastalığı fare modelinde topikal yolla uygulamışlardır. Çalışma kapsamında yapılan morfolojik değerlendirme, kurkumin yüklü PLGA nanopartikülleri içeren hidrojelın kurkumin hidrojeline göre mRNA'daki biyobelirteçler ve protein seviyeleri açısından üstün bir performansa sahip olduğu; *in vitro* psoriatik deri penetrasyon çalışmalarında ise, ilaç süspansiyonu yüklü hidrojele kıyasla nanopartikül yüklü hidrojel uygulamasında deriye daha fazla ilacın nüfuz ettiği/ deride daha fazla ilaç biriktiği belirtilmişlerdir. Lipofilik kurkuminin PLGA ile kapsüllenecek, kurkuminin çözünürlüğünün, kimyasal stabilitesinin ve ilaç penetrasyonunun iyileştirildiği sonucuna varılmıştır (Sun, Liu et al., 2017).

Topikal mantar enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan Ketokonazolün düşük çözünürlüğü nedeniyle biyoyararlanımı sınırlıdır. Bu nedenle, istenen antifungal aktiviteye ulaşmak için daha yüksek miktarda ilaç gerekmektedir. Sadozai ve arkadaşları, emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile Ketokonazol yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamışlardır. Çalışma kapsamında, daha yüksek oranda PLGA'nın Ketokonazol salınımını uzatmasıyla birlikte, ilacın fiziksel yapısını kristalden amorf forma değiştirdiğini ve böylece ilacın çözünürlüğünü arttırmada etkili olabileceğini belirlemişlerdir.

Ayrıca, PLGA yüklü Ketokonazol nanopartikülleri ile gümüş nanopartiküllerinin kombinasyonunun ise antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığını ve bu kombinasyonun hastaya uygulama sıklığını azaltabileceğini, dirençli *C. albicans* suşlarına karşı etkili olabilecek sürekli salım etkisi elde etmek için topikal dozaj formunda ideal bir formülasyon olabileceğini raporlamışlardır (Sadozai, Khan et al., 2020).

Dave ve arkadaşları, emülsifikasyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile Norfloksasin yüklü PLGA nanopartikülleri hazırlamış ve nanopartiküllerden ilacın salım profilini belirlemek için *in vitro* deri geçirgenlik çalışmaları yapmışlardır. Norfloksasin yüklü nanopartiküllerin, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı antimikrobiyal etkinliği koruduğunu, Norfloksasin formülasyonunun yanığa bağlı bakteriyel enfeksiyonların topikal tedavisi için güvenli bir yaklaşım olduğunu belirtmişlerdir (Dave, Kushwaha et al., 2017).

PLGA nanopartiküllerinin, kozmetik ürünlerin performansını artırmak için nanokozmetik formülasyon olarak da kullanıldığı bilinmektedir. Aktif madde yüklü PLGA nanopartiküllerinin cilt beyazlatma ve yaşlanma karşıtı aktivitelerini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ito, Takahashi et al., 2013).

Viera ve arkadaşları geliştirdikleri dermatolojik formülasyonda PLGA ile nano-enkapsülasyonda karotenoid bakımından zengin *Haematococcus pluvialis* ekstraktının antioksidan potansiyelinin askorbik aside kıyasla arttığını gözlemlemişlerdir (Vieira, Derner et al., 2021).

Zhu ve arkadaşları, kuersetin yüklü PLGA-Tokoferil polietilen glikol 1000 süksinat nanopartiküllerinin kuersetin düşük hidrofilikliğini değiştirdiğini ve anti-UVB etkisini arttırdığını gözlemlemişlerdir (Zhu, Zeng et al., 2016).

## **2.6 Kozmetik Sanayiinde Kullanılan Nanotaşıyıcı Sistemler**

### **2.6.1 Veziküler Taşıyıcı Sistemler**

Veziküler taşıyıcı sistemler; dışta bir zar ile kaplı, içleri sıvı ile dolu taşıyıcı sistemlerdir. Hidrofilik ve lipofilik etken maddeleri taşıma özelliğine sahiptirler. Çözünürlüğü az olan ilaçların biyoyararlanımını artırırken, hızla metabolize olan ilaçların eliminasyonunu geciktirir ve ilaçların sistemik dolaşımdaki varlığını uzatırlar.

Lipozomlar, niozomlar, etozomlar, transferezomlar bu grupta yer almaktadır (Suryawanshi, Patil et al., 2021; Chaudhari and Gaikwad, 2020; Kandil, Soliman et al., 2022).

### **2.6.2 Nanoemülsiyonlar**

Cilt tarafından kolayca emilebilen nanoemülsiyonlar, 20-200 nm aralığında değişen damlacık çapına sahip, su içinde yağ (O/W) veya yağ içinde su (W/O) olan koloidal dispersiyonlardır (Kim, Cho et al. 2020). Nanoemülsiyonların yüzey alanları ve küçük boyutlu damlacıkları, daha düşük viskoziteye sahip olmalarını sağlamaktadır. Böylece aktif maddeler cilde daha verimli bir şekilde iletilmektedir (Ashaolu, 2021).

Bulanıklık, kremleşme ve çökelme kararsızlık belirtileri olduğu için nanoemülsiyonlar yarı kararlı sistemler olarak da bilinmektedirler. Nanoemülsiyonlar, ilaç aktif madde çözünürlüğünü iyileştirmek ve ilaç aktif maddesini hidroliz ve enzimatik bozulmadan korumak için kullanılmaktadırlar (Sarheed, Dibi et al., 2021).

Nanoemülsiyonların cilt üzerinde topikal olarak uygulanması, ince bir lipid filmin homojen bir şekilde oluşmasını sağlayarak daha yüksek performans ve biyoyararlanıma imkan vermektedir (Sonneville-Aubrun, Yukuyama et al., 2018).

### **2.6.3 Katı Lipid Nanopartiküller**

Katı lipid nanopartiküller, oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipidler ile hazırlanıp emülgatörler ile stabilize edilen, parçacık boyutları 10-1000 nm arasında olan kolloidal taşıyıcılardır. Etkin maddenin kontrollü salımına ve ilaç hedeflemesine olanak sağlamaktadırlar. Azaltılmış toksisite, büyük ölçekli üretim olasılığı, daha yüksek yükleme kapasitesi, kimyasal çok yönlülük ve lipidlerin biyolojik olarak parçalanabilirliği gibi avantajlara sahiptirler. Ayrıca, UV tutucu özellikleri de olup kimyasal güneşten koruyucular için iyi bir bileşendirler.

Topikal olarak uygulandıklarında, cildin yüzeyinde ince bir lipid filmi oluşturarak, cildi nemli tutan su buharlaşmasına karşı bariyer görevi görmektedirler. Nanometrik boyutları daha derin deri penetrasyonu sağlarken, yükün daha homojen dağılımına destek vermektedir.

Uçucu yağların; yara iyileşmesi ve yara izi tedavisi, gençleştirme, hidrasyon ve elastikiyet için yaygın olarak kullanılan topikal uygulamalar mevcuttur (KAPTANOĞLU, 2013; Jose and Netto, 2019; Souto, Baldim et al., 2020; Souto, Zielinska et al., 2020).

#### **2.6.4 Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar**

Nano yapıli lipid taşıyıcılar; bir katı lipid ve sıvı lipid karışımı kullanılarak, sulu dispersiyon içinde stabilize edilerek hazırlanmaktadır. Elde edilen karışım, vücut sıcaklığında katı olan amorf bir katı oluşturmaktadır. Parçacık boyutları 10 ila 1000 nm arasında değişkenlik göstermektedir. Fizyolojik ve biyouyumlu lipidler formüle etmek için kullanılmaktadır. Bileşiminde yağ bulunması, özellikle lipofilik bileşikler için yükleme kapasitesinin artmasına katkı sağlamakta; katı lipidlerin ise depolama sırasında tekrar kristalleşmesini engellemektedir. Yağ ilavesi katı lipidlerin tekrar kristalleşmesini engellediği için termodinamik olarak daha kararlı bir sistem elde edilir. Deri yüzeyinde ince bir film tabaka oluşturarak hidrasyonun sağlanmasında da oldukça etkilidirler (Bisso and Leroux, 2020; Dhawan, Sharma et al., 2020).

Transdermal olarak uygulandıklarında, yüklenen ilacın terapötik etkisini arttırarak, aynı terapötik etkinin daha düşük dozda sağlanmasına olanak verirler. Çözünürlüğü ve geçirgenliği düşük olan ilaçlar için biyoyararlanımlarını arttırdıkları için bu sınıftaki ilaçlarda kullanımları tercih edilmektedir (Brito Raj, Chandrasekhar et al., 2019).

Nanotaşıyıcı sistemler içeren ticari ürünlere örnekler Tablo 2.1’de sunulmuştur (Kushwaha, Minocha et al., 2020; Souto, Baldim et al., 2020; Zhou, Luo et al., 2021).



**Tablo 2.1** Nanotaşıyıcı sistemler içeren kozmetik ürünlere örnekler

| Nanotaşıyıcı                        | Ürün Kategorisi                  | Ürün İsmi                     | Üretici        |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|----------------|
| <b>Lipozom</b>                      | Anti-aging                       | C-Vit Liposomal Serum         | Sesderma       |
|                                     | Kırışıklık önleyici              | Capture                       | Christian Dior |
|                                     |                                  | Eye Defense Eye Cream         | L'Oreal Paris  |
|                                     | Nemlendirici                     | Moisture Liposome Cream       | Decorte        |
| <b>Niozom</b>                       | Anti-aging                       | Niosome Plus                  | Lancome        |
|                                     | Nemlendirici                     | Absolute White Cream          | Lancome        |
|                                     | Saç dökülmesi                    | Identik Floral Repair         | Identik        |
| <b>Nanoemülsiyon</b>                | Anti-aging                       | Phyto-Endorphin Hand Cream    | Rhonda Allison |
|                                     | Nemlendirici                     | Precision                     | Chanel         |
|                                     |                                  | Vital nanoemulsion A-VC       | Maria Lousie   |
| <b>Katı Lipid Nanopartiküller</b>   | Kırışıklık önleyici              | Soosion Facial Lifting Cream  | Soosion        |
|                                     | Nemlendirici                     | Allure                        | Chanel         |
|                                     |                                  | Phyto NLC                     | Sireh Emas     |
| <b>Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar</b> | Anti-aging / Kırışıklık önleyici | Cutanova-Cream Nanorepair Q10 | Dr. Rimpler    |
|                                     | Nemlendirici                     | Regeneration cream            | Scholl         |

## 2.7 Topikal Formülasyonlar

Genel olarak, sistemik veya lokal etkiye yönelik topikal formülasyonlar; katılar, yarı katılar ve sıvılar olarak sınıflandırılmaktadır.

Yarı katı formülasyonlar, diğer formülasyonlara göre uygulama yüzeyine yapışma özellikleri ile ciltte daha uzun süre kalabilmektedirler. Yarı katı formülasyonlar sınıfında en yaygın kullanılan formlar merhemler, losyonlar, jeller ve kremlerdir (DJOBIE TCHIENOU, TSATSOP TSAGUE et al., 2018; Mayba and Gooderham, 2018; Annunziata, Cacciapuoti et al., 2020).

### 2.7.1 Merhemler

Merhemler, cilt üzerinde oluşturdıkları tıkaçıcı tabaka ile ısı ve su kaybını önleyen, genellikle beyaz yumuşak parafin olan hidrofilik yağlı bir baz içeren yarı katı preparasyonlardır.

Merhemler, kremler ve losyonlara göre cilde daha az yayılmakta, gövde ve ekstremiteler gibi vücudun daha kuru bölgelerinde çok iyi tolere edilmektedirler. Stratum corneum'un rehidrasyonu ile sonuçlanan kuru, hiperkeratotik pullu psoriasis plakları ideal merhem uygulaması için prototip bir örnektir (Mayba and Gooderham, 2018).

### **2.7.2 Jeller**

Jeller, çözücü olarak işlev gören bir sıvı bileşen ve jelleştirici madde olarak işlev gören bir katı bileşenden oluşan yarı katı formülasyonlardır. Genellikle, cilt ile temas ettiklerinde sıvılaşan, yağsız, tıkayıcı olmayan bir film oluşturmaktadırlar. Jeller, önemli miktarda su tutarak cildi nemlendirmekte; böylece aktif maddelerin daha fazla çözünmesine olanak sağlayarak, transepidermal göçlerini kolaylaştırmaktadırlar (Annunziata, Cacciapuoti et al., 2020).

### **2.7.3 Hidrojeller**

Hidrojeller, aynı veya farklı tipte sentetik polimerlerin ve/veya yüksek su emme kapasitesi sunan biyopolimerlerin çapraz bağlı ağlarıdır (Mitura, Sionkowska et al., 2020)

Hidrojeller, büyük miktarlarda su veya biyolojik sıvıları emme kabiliyetine sahip üç boyutlu hidrofilik polimerik ağlardır. Uygun bir hidrofilik ajanla jel haline getirilmiş sulu bir dispersiyon ortamından oluşmaktadırlar.

Doğal ve sentetik biyopolimerlerden oluşturulan hibrit matrisler, hidrojellerin niteliklerinin başarılı bir şekilde dengelenmesiyle sonuçlanmaktadır. Etkili yara iyileşmesi amacıyla birçok terapötik ajan hidrojellere yüklenmektedir (Esposito, Barbosa et al., 2020).

### **2.7.4 Emüljeller**

Su fazında bir jelleştirici maddenin varlığı, klasik bir emülsiyonu bir emüljele dönüştürmektedir. Son zamanlarda, nanosüspansiyon bazlı jeller, cilde iletimi artırma yetenekleri nedeniyle topikal uygulamaların geliştirilmesinde büyük ilgi görmüştür (Sharma, Nayak et al., 2018).

Emülgellerin geliştirilmesi ile birlikte hidrofobik ilaçlar jel dozaj formlarına dahil edilebilmiştir. Dermatolojik kullanıma yönelik emülgeller; şeffaf, yağsız, kolay sürülebilir ve çıkarılabilir, leke bırakmayan özelliklere sahiptirler (Yadav, Wairkar et al., 2017).

Lipofilik ilaçların çoğu çözünürlük problemi sebebiyle doğrudan hidrojel olarak formüle edilemezken, emülgeller olarak kolayca formüle edilebilmektedirler. Bu sebeple emüljel, hidrojele kıyasla lipofilik ilacın daha iyi stabilitesini ve salınımını sağlamaktadır (Daood, Jassim et al., 2019).

### **2.7.5 Losyonlar**

Losyonlar, ince bölünmüş çözünmeyen bir ilacın süspansiyon haline getirildiği veya dağıtıldığı sıvı preparatlardır. Cilde harici uygulama için kullanılan bir emülsiyon sıvı dozaj formu olarak tanımlanmaktadır (Garg, Rath et al., 2015).

### **2.7.6 Kremler**

Kremler, yağ içinde su (yağlı kremler) veya su içinde yağ (kaybolan kremler) emülsiyonlarıdır ve aktif madde, bölme katsayısına göre yağ ve su fazları arasında dağılır.

Suda yağ emülsiyonları, suda çözünen etken maddeler için uygunken; yağda su emülsiyonları, yağda çözünen etken maddeler için uygundur.

Merhemlerle karşılaştırıldığında, kremler önemli ölçüde daha az yağlı, daha az viskoz ve daha iyi sürülebilirdirler.

Krem formülasyonlarının ana bileşenlerini nemlendiriciler, yumuşatıcılar, emülgatörler, ve çözücüler oluşturmaktadır (Ansari, McGuinness et al., 2020; Thatai and Khan, 2020; Khare, Abhyankar et al., 2021).

#### **2.7.6.1 Nemlendiriciler (Humektanlar)**

Humektanlar, SC' a kolayca nüfuz edebilen hidrofilik bileşiklerdir. Biyolojik sünger görevi gören humektanlar; suyu dermisten epidermise çekerek, ciltte suyu tutarak hidrasyonun sürdürülmesine ve su kaybının azaltılmasına olanak sağlarlar. Bazı humektanlar ayrıca yumuşatıcı özelliklere de sahiptirler (Barnes, Mijaljica et al., 2021; Ali, Skedung et al., 2022).

### 2.7.6.2 Yumuşatıcılar

Yumuşatıcılar, korneositler arasındaki boşlukları doldurarak SC'un hücre içi çift katmanlarını simüle ederler. Cilde, su kaybını önlemek için bir yağ tabakası sağlayarak; cildin su tutma yeteneğini artırır. Cildi yumuşatmaya ve kuruyan cildi tedavi etmeye yardımcı olurlar (Chauhan and Gupta, 2020; Barnes, Mijaljica et al., 2021)

### 2.7.6.3 Emülgatörler

Emülgatörler, kozmetik emülsiyonların reolojik özelliklerini ve aktif bileşenlerin deri geçirgenliğini belirlemede; krem formülasyonlarının stabilitesinde, fazlar arası gerilimi azaltmak ve tek tip bileşimler oluşturmak için önemli rol oynarlar (Montenegro, Rapisarda et al., 2015; Wojciechowska, Walczak et al., 2021).

Tez çalışması kapsamında krem formülasyonlarında kullanılan hammaddeler ve özellikleri Tablo 2.2'de verilmiştir (Sheskey et al., 2017; FDA, 2018).

**Tablo 2.2** Formülasyon çalışmalarında kullanılan hammaddeler ve özellikleri

| Hammadde                           | Fonksiyon                                                                                                                                                                                                                                                               | Önerilen Kullanım %                                                            |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Gliserin</b>                    | Topikal farmasötik formülasyonlarda ve kozmetiklerde; nemlendirici, yumuşatıcı ve yardımcı çözücü olarak kullanılır.                                                                                                                                                    | Yumuşatıcı ve nemlendirici olarak kullanım; < %30                              |
| <b>Gliserol Monostearat</b>        | Gliseril monostearatın birçok çeşidi, farmasötik ve kozmetik uygulamalarda emülgatör, stabilizatör ve yumuşatıcı olarak kullanılır. Etkili bir stabilizatör olup polar ve polar olmayan bileşikler için ortak bir çözücü olarak işlev görür.                            | Topikal merhemlerde kullanım;<br>≤ %5<br>Topikal losyonlarda kullanım;<br>≤ %9 |
| <b>Izopropil miristat</b>          | Cilt tarafından kolayca emilen, yağsız bir yumuşatıcıdır, transdermal formülasyonlar için penetrasyon artırıcı ve çözücü olarak kullanılır.                                                                                                                             | Topikal krem ve losyonlarda kullanım;<br>%1.0-%10                              |
| <b>Kaprilik/Kaprik Trigliserit</b> | Cilt üzerinde iyi yayılma ve iyi penetrasyon özelliklerine sahiptir. Kozmetik ve topikal farmasötik preparasyonlarda kullanılan polar yumuşatıcıdır.                                                                                                                    | ≤ %8                                                                           |
| <b>Polisorbat 60</b>               | Polisorbatlar, farmasötik emülsiyonlarının hazırlanmasında emülgatör olarak kullanılan hidrofilik noniyonik yüzey aktif maddelerdir. Polisorbatlar, uçucu yağlar ve yağda çözünen vitaminler dahil olmak üzere çeşitli maddeler için çözücü olarak da kullanılmaktadır. | Topikal formülasyonlarda emülgatör olarak kullanım;<br>%1-%15                  |
| <b>Setostearil Alkol</b>           | Setostearil alkol, topikal farmasötik formülasyonlarda viskozite artırıcı ve emülgatör olarak kullanılır. Aynı zamanda emülsiyonu stabilize eder.                                                                                                                       | Krem formülasyonlarında<br>≤ %8                                                |

### 2.7.7 Anti Aging Kremler

Kimyasal ürünler, kirlilik, stres, kızılötesi ve UV ışınları cilt yaşlanmasında önemli rol oynar. Anti aging kremler; cildin elastikiyetini arttırmaya ve cilde sıkı bir görünüm kazandırmaya yardımcı olur. Cildi toparlayıcı etkide bulunarak ciltteki kırışıklık, çizgi görünümünün azalmasına, pürüzsüz bir cilt yüzeyi ve belirgin cilt hatlarının oluşmasına destek olurlar.

Nanoteknoloji kullanılarak üretilen anti aging kremlerde ise, nanopartiküller cildin derinliklerine nüfuz edebileceği için E vitamini, retinol gibi ilaçların yaşlanma karşıtı bileşenler olarak daha iyi performans göstermesi beklenmektedir (Nanda, Khurana et al., 2015; Nanda, Nanda et al., 2015; Nanda, Nanda et al., 2016).

Anti aging ürünler için küresel pazar büyüklüğü 2021 yılında 62.6 Milyar Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Doları değerindeyken, pazarın 2027 yılına kadar 93.1 Milyar ABD Dolarına ulaşması ve 2022-2027 döneminde % 6.74' lük bir büyüme oranı kaydetmesi beklenmektedir.

Anti aging ürünler için küresel pazar büyüklüğü, Tablo 2.3' de sunulduğu üzere yaş grubu, cinsiyet, gelir düzeyi ve ülke kategorilerde incelendiğinde 35-55 yaş grubundaki tüketicilerin, kadınların, yüksek gelir grubuna sahip tüketicilerin, ülkeler kategorisinde ise Fransa'nın pazara yön verdiği görülmektedir.

**Tablo 2.3** Anti aging ürünlere ait pazar araştırması

| Kategori     | Araştırma Grubu ve Bulgular                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Yaş Grubu    | 25-35 yaş, 35-55 yaş, 55 ve üzeri yaş grupları incelendiğinde; 35-55 yaş grubundaki tüketiciler, toplam küresel pazarın yarısından fazla bir pay ile pazara hakimdir.                                                                                                                                                                |
| Cinsiyet     | Pazar, erkek ve kadın tüketici grupları olarak incelendiğinde kadınlar pazara hakimdir.                                                                                                                                                                                                                                              |
| Gelir Düzeyi | Yüksek, orta ve düşük gelir düzeyleri incelendiğinde; yüksek gelir grubu segmentindeki tüketiciler pazara hakimdir.                                                                                                                                                                                                                  |
| Bölge        | Ülke bazında Fransa, yüksek yaşam standartları ve tüketiciler tarafından birinci sınıf anti aging ürünlerin tüketimi nedeniyle pazara hakimdir. Diğer büyük ülkeler arasında Almanya, İtalya, Birleşik Krallık, Rusya, İspanya, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, Japonya, Güney Kore, Çin, Tayland ve Hindistan bulunmaktadır. |

Son yıllarda, tüketici taleplerinin artış göstermesi ile paralel olarak çeşitli firmalar tarafından kullanıma sunulan anti aging kremlerin sayısı giderek artış göstermiştir. Tablo 2.4’ de piyasada bulunan anti aging kremlere örnekler verilmiştir (Nguyen and Rajendran, 2020; Salvioni, Morelli et al., 2021; Samdavid Thanapaul, Paulraj et al., 2022).

**Tablo 2.4** Piyasada bulunan anti aging kremlere örnekler

| <b>Ticari İsim</b>                                              | <b>Marka</b>                     |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Active Anti-Aging Face Cream                                    | Perris Swiss Laboratory          |
| Ageless                                                         | Facelift cream I-Wen<br>Naturals |
| Antiage Response Cream                                          | Nouvelle-HSA Cosmetics           |
| Bepanthol Protect Facial Cream Ultra                            | Bayer HealthCare                 |
| Chantecaille Nano Gold Energizing Cream                         | Chantecaille                     |
| Cream Nanorepair Q10                                            | Dr. Rimpler GmbH                 |
| Cutanova Cream Nanovital Q10                                    | Dr. Rimpler                      |
| Dragon's Blood Hyaluronic Night Cream                           | Rodial                           |
| Lancôme Soleil Soft-Touch Anti-Wrinkle Sun Cream SPF 15         | Lancôme                          |
| Lancôme Renergie Microlift                                      | Lancôme                          |
| LR Nano Gold Day & Silk Day Cream                               | LR Zeitgard                      |
| Renewal Jelly Aquarysta                                         | Astalift                         |
| Resveraderm ANTIOX                                              | Sesderma                         |
| RevitaLift Anti-Wrinkle and Firming Face and Neck Contour Cream | L'Oreal                          |
| RevitaLift Double Lifting                                       | L'Oreal                          |
| Sircuit Addict Firming Antioxidant Serum                        | Sircuit Skin Cosmeceuticals      |
| Skin Caviar                                                     | La Prairie                       |
| Zelens Fullerene C-60 Night Cream                               | Zelens                           |

## 2.8 Bitkisel Kozmetikler

Doğal antioksidanlar, cilt hastalıklarıyla yakından ilişkili fotoyaşlanma ve oksidatif stresin önlenmesini sağlayan yararlı bir strateji olarak düşünülmektedir. Doğal antioksidanların zengin kaynaklarından bir grubu bitkiler oluşturmaktadır. Bitki özleri, ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kullanılan en büyük ve en değerli içerik gruplarından biridir (Mota, Silva et al., 2018).

Bitki özleri, güçlü antibakteriyel, antifungal ve antiviral aktivitelerine ek olarak güçlü antioksidan özellik gösterirler, kozmetikte esas olarak ürün kalitesini artırmak ve işlevselliği iyileştirmek için kullanılmaktadır (Zagórska-Dziok, Ziemlewska et al., 2020; Akhtar, Rafiullah et al., 2022).

Bitkisel kozmetikler genellikle kuru cildi nemlendirme, yaşlanmayı geciktirme, kırışıklıkları azaltma, cilt rengini açma, saç bakımı ve anti oksidatif kirlilik önleyici etki sağlama gibi amaçlar için geliştirilmektedirler (Yapar, 2017).

Sentetik kozmetiklere göre daha az yan etkiye sahip olduğu için bitkisel kozmetiklerin kullanımı önerilmektedir (Joshi, Pawar, 2015; Kaur, Singh et al., 2020; Fernando, 2021).

Tablo 2.5' de piyasada yer alan anti aging ürünlerin yapısında bulunan yaygın bitkisel içerikler ve cilde yararları sunulmuştur (Ferreira, Magalhães et al., 2021).

**Tablo 2.5** Anti aging ürünlerin yapısında bulunan yaygın bitkisel içerikler ve cilde yararları

| Bitkisel İçerik                     | Cilde yararları                                                                                                                |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Butyrospermum parkii yağı           | Antioksidan, kolajen sentezi aktivasyonu, MMP inhibisyonu, UV kaynaklı cilt hasarı önleme                                      |
| Calendula çiçek özü                 | Antioksidan, hücre ömrü uzatıcı                                                                                                |
| Glycyrrhiza glabra yaprağı ekstresi | Antikanser, antioksidan, anti-inflamatuar ve östrojenik etkiler, UV kaynaklı cilt hasarı önleme                                |
| Helianthus annuus tohumu yağı       | Antioksidan, anti-inflamatuar, anti-tirozinaz, MMP inhibisyonu, UV kaynaklı cilt hasarı önleme                                 |
| Simmondsia chinensis tohumu yağı    | Antioksidan, yara iyileştirici                                                                                                 |
| Simmondsia chinensis yağı           | Antioksidan, yara iyileştirici                                                                                                 |
| Soya izoflavonları                  | Antioksidan, anti-inflamatuar ve östrojenik etkiler, UV kaynaklı cilt hasarı önleme                                            |
| Theobroma kakao çekirdeği yağı      | Antioksidan, anti-inflamatuar, kolajen sentezi aktivasyonu, MMP inhibisyonu, UV kaynaklı cilt hasarı önleme                    |
| Vitis vinifera meyve özü            | Antioksidan, anti-inflamatuar, kolajen sentezi aktivasyonu, MMP inhibisyonu, UV kaynaklı cilt hasarı önleme, yara iyileştirici |
| Vitis vinifera tohumu özü           | Antioksidan, anti-inflamatuar, anti-tirozinaz, kolajen sentezi aktivasyonu, MMP inhibisyonu, UV kaynaklı cilt hasarı önleme    |

### 2.8.1 *Glycyrrhiza glabra L.*

Fabaceae (Baklagiller) familyasından olan *Glycyrrhiza glabra L.* (meyan kökü), tıbbi olarak geniş kullanım alanına sahip olan çok yıllık küçük bir bitkidir. *Glycyrrhiza glabra L.*, geçmişten günümüze ateş, felç, mide ülseri, hiperdipsi, epilepsi, romatizma, solunum bozuklukları, cilt hastalıkları, hemorajik hastalıklar gibi birçok hastalığı tedavi etmek için kullanılmaktadır (Tewari, Mocan et al., 2017, El-Saber Batiha, Magdy Beshbishy et al., 2020). *Glycyrrhiza glabra*'nın bildirilen farmakolojik aktiviteleri Tablo 2.6' da sunulmuştur (Kaur, Kaur et al., 2021).



**Tablo 2.6** *Glycyrrhiza glabra L.*'nin bildirilen farmakolojik aktiviteleri

| Aktivite                     | Ekstrakt                                     |
|------------------------------|----------------------------------------------|
| Antidislipidemik aktivite    | Etanol ekstraktı                             |
| Antienflamatuvar aktivite    | Hidroalkolik ekstrakt                        |
| Antikanser aktivite          | Meyan ekstraktı                              |
| Antikonvülsan aktivite       | Heksan, etanol, metanol, yaprak ekstraktı    |
| Antimalaryal aktivite        | Alkollü ekstraktı                            |
| Antimikrobiyal aktivite      | Eter, kloroform, aseton                      |
| Antimikobakteriyel aktivite  | Metanolik ekstraktı                          |
| Antinosiseptif aktivite      | Etanol ekstraktı                             |
| Antioksidan aktivite         | Metanol ekstraktı                            |
| Antistres aktivite           | Alkollü ve sulu ekstraktı                    |
| Antitusif aktivite           | Etanol ekstraktı                             |
| Antiülser aktivite           | Yaprakların sulu, aseton, etanolik ekstraktı |
| Antiviral aktivite           | Sulu ekstrakt                                |
| Enzim inhibe edici aktivite  | Metanol ekstraktı                            |
| Hafıza Geliştirme aktivitesi | Sulu kök ekstraktı                           |
| Hepatoprotektif aktivite     | Sulu kök ekstraktı                           |
| İmmünomodülatör aktivite     | Sulu ekstrakt                                |
| Kronik yorgunluk stresi      | Hidroalkolik ekstrakt                        |
| Östrojenik aktivite          | Alcoholic extract                            |
| Sitotoksik aktivite          | CHCl <sub>3</sub> , metanol ve sulu ekstrakt |
| Testiküler toksisite         | Sulu ekstrakt                                |

Bunun yanı sıra, *Glycyrrhiza glabra L.*'nin cilt beyazlatma, cilt depigmenti, cilt elastikiyetini koruma ve kırışıklıkları önleme, yumuşatıcı, antiakne aktivite özellikleri mevcuttur (Hooda, 2015).

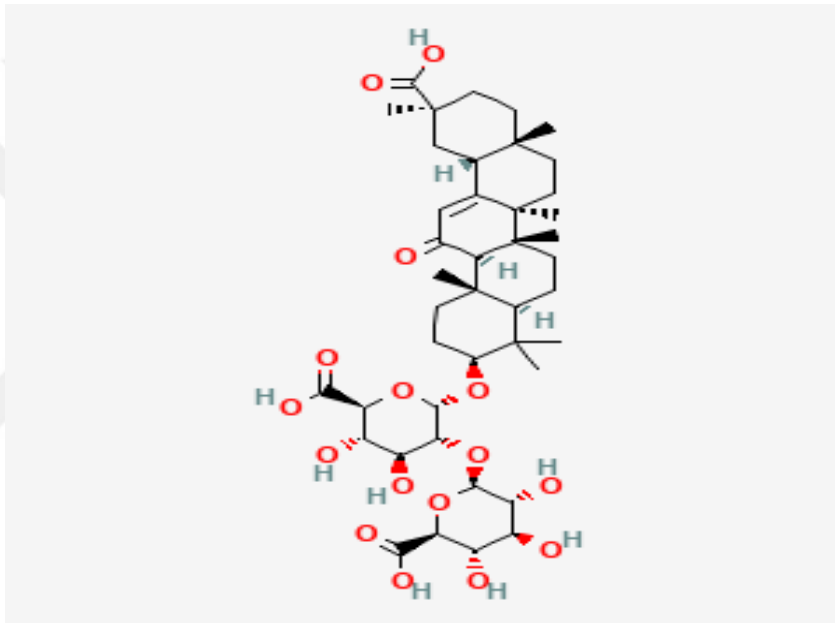
*Glycyrrhiza glabra L.*, flavonlar, izoflavonlar, kalkonlar ve genellikle glikozitler olarak bulunan çeşitli bileşiklerle birlikte glisirizin ve glisirretik asit gibi çeşitli triterpenleri içermektedir (Siracusa, Saija et al., 2011; Arora, Wani et al., 2019; El-Saber Batiha, Magdy Beshbishy et al., 2020). *Glycyrrhiza glabra L.* içeren farmasötik müstahzarlara ait örnekler Tablo 2.7' de sunulmuştur (Kaur, Kaur et al. 2021).

**Tablo 2.7** *Glycyrrhiza glabra L.* içeren farmasötik müstahzarlar

| İlaç İsmi                                                       | Üretici Firma              | Terapötik Kullanım                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Banyan botanicals licorice root powder                          | Banyan botanicals          | Doğal balgam söktürücü ve yatıştırıcı, kuru öksürük, üreme sistemi, dengeli adrenalleri ve böbreklerin düzgün çalışmasını destekleyici |
| Brefus Glycyrrhiza glabra L.                                    | Brefus                     | Farenjit, akut ve kronik bronşit, yoğun öksürük veya sekresyon durumlarında balgam söktürücü                                           |
| Chewable DGL Liquorice tablets                                  | Nature's Garden            | Sağlık takviyesi                                                                                                                       |
| Glycyrrhiza glabra 1X                                           | Dr. Willimar Schwabe       | Öksürük, boğaz ağrısı                                                                                                                  |
| Gut Gard                                                        | Natural remedies           | Mide bağırsak yoluna destek, mide ekşimesini yatıştırıcı, antioksidan destekleyici                                                     |
| Licorice root                                                   | Pure Science Supplements   | Sindirim ve solunum fonksiyonlarını destekleyici, balgam söktürücü ve yatıştırıcı                                                      |
| Health Aid Licorice (CG 50ml)                                   | Health aid                 | Kuru öksürük giderici, rahat nefes almayı destekleyici                                                                                 |
| Himalaya clear complexion whitening face wash                   | Himalaya                   | Karanlık noktaları giderir, Kirleri temizler ve arındırır                                                                              |
| Himalaya pure herb-licorice                                     | Himalaya herbal healthcare | Mide desteği, mukoz zarları yatıştırır, mide zarındaki fazla asidi dengeler ve rahat sindirimi destekler.                              |
| Illuminate clean face cleanser                                  | Younique                   | Yağlı ciltler için yüz temizleyici olarak kullanılır                                                                                   |
| Liqorice extract-resist barrier repair moisturizer with retinol | Seattle                    | Kırışıklıkları giderir ve yaşlanma karşıtı özelliklere sahiptir.                                                                       |
| Nature's sunshine licorice roots                                | Nature's sunshine          | Başta karaciğer ve böbrek üstü bezleri olmak üzere glandüler sistemi destekler                                                         |
| Solaray Licorice 450 mg                                         | Nutraceutical              | Sağlık takviyesi                                                                                                                       |
| The Nature Republic Cotton Armpit Cream                         | Nature Republic            | Sakinleştirici, pudramsı kokusuyla koltuk altı bölgelerini beyazlatma, aydınlatma ve kokuyu giderme iddiası                            |

### 2.8.2 Glisirizik Asit (GA)

*Glycyrrhiza glabra L.* köklerinin ana bileşiklerinden biri olarak bilinen GA, bir triterpen glikozittir. Şekil 2.6'da yapısı sunulan GA molekülleri, bir molekül hidroforik glisiretinik asit ve iki molekül hidroforik glukuronik asitten oluşmaktadır. Belirli koşullar altında, bir ilaç dağıtım sistemi potansiyeline ve hidroforik bir iç boşluğa sahip nanomiselleri veya jelleri oluşturmak için sulu çözelti içinde kendi kendine bir araya gelebilmektedir (Su, Wu et al., 2017; Zhao, Zhang et al., 2019).



Şekil 2.6 GA molekül yapısı (N. C. f. B. Information, 2022)

GA, eski çağlardan beri geleneksel Çin ve Japon tıbbında kullanılan aktif bir bileşendir (Li, Cao et al., 2014). GA, anti-enflamatuar, anti-ülser, anti-alerjik, antioksidan, anti-tümör, anti-diyabetik ve hepatoprotektif gibi birçok terapötik etkiye sahip olmasının yanı sıra diğer ilaç moleküllerinin terapötik etkisini de arttırmaktadır (Selyutina, Polyakov, 2019).

GA, tuzları ve esterleri meyan kökü bitkilerinden izole edilebilen; çeşitli cilt bakım ürünlerinde kullanımı olan kozmetik bileşenlerdir. GA ayrıca insan dermal fibroblastlarında UVB kaynaklı fotoyaşlanmaya karşı inhibe edici etki göstermektedir (Afnan, Adil et al., 2012; Nascimento, de Araújo, 2022).

## 2.9 *In Silico* Yöntemler

Bilgisayar teknolojisindeki son gelişmeler ve terapötik özellikli hedef sayısının artışına paralel olarak yapısal, kimyasal ve biyolojik verilerin hızla çoğalması *in silico* analizlerinin son yıllarda kullanımını önemli ölçüde yaygınlaştırmıştır (Macalino, Gosu et al., 2015).

*In silico* analiz yöntemleri kullanılarak uygun bir sürede milyonlarca bileşiğin sanal olarak taranması sağlanabilir. Böylece uygun hedefin tespitinde ilk maliyetleri azaltılması ve istenen ilaç adaylarını bulma şansı arttırılması mümkün olmaktadır (McNutt, Francoeur et al., 2021).

Yapıya dayalı yöntemler, ilgilenilen hedefin üç boyutlu yapısının bilgisinden elde edilen bilgilere dayanmakta ve belirli bir hedefe yönelik ligandların yapısal ve elektronik tamamlayıcılığına göre moleküllerin veri tabanlarının sıralanmasına izin vermektedirler (Pinzi and Rastelli, 2019).

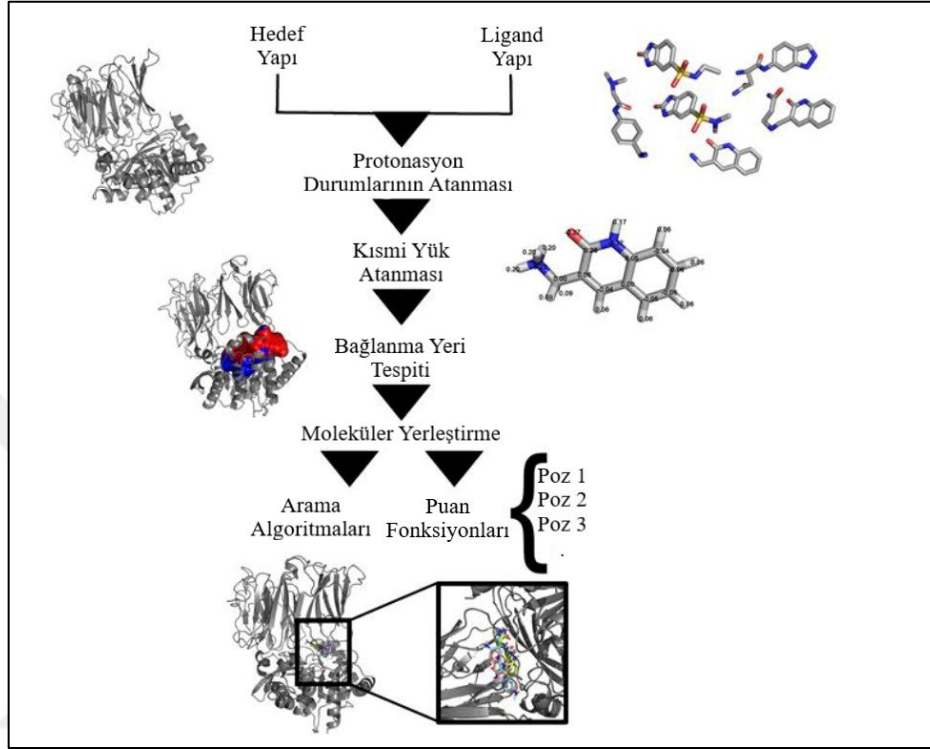
### 2.9.1 Moleküler Kenetlenme

Moleküler kenetlenme; moleküller ve biyolojik hedefler arasında meydana gelen etkileşimleri tahmin etmeye yardımcı olan, moleküllerin bir makromoleküler hedefin bağlanma bölgesindeki konformasyonunu ve oryantasyonunu analiz eden, sık kullanılan yapı tabanlı *in silico* yöntemlerden biridir (Torres, Sodero et al., 2019).

Moleküler kenetlenme hesaplamasındaki ilk adım, genellikle büyük bir biyolojik molekülden (protein, DNA veya RNA) oluşan hedef yapıyı elde etmektir. Bu makromoleküllerin yapıları, deneysel yöntemlerle elde edilen üç boyutlu atomik koordinatlara erişim sağlayan Protein Veri Bankası'ndan sağlanabilmektedir. Hedefin deneysel üç boyutlu yapısının mevcut olmaması durumunda ise, proteinlerin üç boyutlu yapısını elde etmek için karşılaştırmalı ve ab initio modelleme gibi hesaplamalı tahmin yöntemleri kullanılabilir.

Daha sonra protonasyon durumları ve kısmi yükler atanmaktadır. Daha önce bilinmiyorsa, hedef bağlanma yeri saptanır ya da bir kör kenetlenme simülasyonu gerçekleştirilebilir.

Moleküler kenetlenme hesaplamaları poz verme ve puanlama olarak iki ana adımda gerçekleştirilir, böylece hedef ve ligandlar arasındaki olası komplekslerin sıralı bir listesini oluşturulur (Torres, Sodero et al., 2019; McNutt, Francoeur et al., 2021).



**Şekil 2.7** Moleküler kenetlenme hesaplamalarının genel akışı  
(Torres, Sodero, et al., 2019)

Moleküler kenetlenme çalışmalarının kullanım alanları ve uygulamaları zamanla değişiklik göstererek çeşitlenmiştir. Moleküler kenetlenme, ilk olarak büyük ve küçük moleküller arasındaki moleküler tanımayı araştırmak için geliştirilmişken, daha sonra optimizasyon, ilaç yeniden konumlandırma, ters hedef tanımlama, çok hedefli ligand tasarımı ve yeniden konumlandırma gibi ilaç keşif programlarının çeşitli bölümlerinde yaygın kullanım alanına sahip olmuştur (Lee, Lee et al., 2016).

### 2.9.2 Moleküler Dinamik (MD) Simülasyon Analizleri

Moleküler kenetlenme bir vakum ortamında anlık protein-ligand kenetlenmesini, bu kenetlenmenin enerjisini, dolayısıyla kararlılığını ve kenetlenme için etkili etkileşim mekanizmalarını vermektedir.

Ancak reseptör sistemlerinin doğal esnekliği ve vücut benzeri bir yapıya sahip olan su sistemi içinde kenetlenme doğası hakkında ayrıntılı bilgi sağlayamaz. Bu durumlar MD analizi ile açıklığa kavuşturulabilir.

MD yapısal biyokimya, moleküler biyoloji, farmasötik bilim ve biyoteknoloji alanındaki dinamik özelliklerin ve süreçlerin araştırılması için yaygın olarak uygulanan yöntemlerden biridir (Singh, Vanga et al., 2018).

Simülasyonun uzunluğu, her bir zaman adımında değerlendirilmesi gereken etkileşimlerin sayısı ve üretilmesi gereken zaman adımları ve serbestlik dereceleri de dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından belirlenir. Bu nedenle, simülasyon ve hesaplama verimliliğini artırmak için çeşitli algoritmalar kullanılmaktadır.

### **2.9.3 Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım ve Toksisite (ADMET)**

İlaç adayları için klinik deneylere başlanmadan önce ADMET profili çalışması yapılması, klinik denemelerin belirli bir aşamasında başarısızlığı ve geri çekilmeyi önlemede son derece önemlidir. Bu nedenle, ADMET profili oluşturma tasarlanmış ve aday ilaçların güvenliğini ve stabilitesini sağlarken aynı zamanda maliyet ve zaman açısından tasarruf sağlamaktadır (Yang, Sun et al., 2018; Kar and Leszczynski, 2020).

SwissADME, küçük moleküllerin ADME özelliklerinin hesaplanması, farmakokinetik ve fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi için geliştirilen son teknoloji web tabanlı araçlardan biridir (Yang, Sun et al., 2018; Sravika, Priya et al., 2021).

SwissADME, bir kimyasal için P-gp substratı ya da en önemli sitokrom P450 (CYP) izoenzimlerinin inhibitörü olduğu tahminini sağlar. Moleküllerin CYP izoenzimleri ile etkileşim bilgileri önemlidir. Bu izoenzim süper ailesi, metabolik biyotransformasyon yoluyla ilaç eliminasyonunda kilit bir oyuncudur.

CYP ve P-gp'nin dokuların ve organizmaların korunmasını iyileştirmek için küçük molekülleri sinerjik olarak işleyebileceği öne sürülmüştür. Terapötik moleküllerin % 50 ila % 90'ının beş ana izoformun (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4) substratı olduğu tahmin edilmektedir.

Bu izoenzimlerin inhibisyonu, ilacın veya metabolitlerinin daha düşük klirensi ve birikimi nedeniyle toksik veya diğer istenmeyen yan etkilere yol açan farmakokinetikle ilişkili ilaç-ilaç etkileşimlerinin kesinlikle önemli bir nedenidir (Daina, Michielin et al., 2017).

ProTox-II, küçük moleküllerin toksisitesinin tahmini için kullanılan bir web sunucusudur (Banerjee, Eckert et al., 2018). 33 ML modeline dayalı olarak; çeşitli toksisite son noktaları, akut toksisitesi, hepatotoksisite, sitotoksisite, karsinogenisite, mutajenite, immünotoksisite, olumsuz sonuç yolları ve toksisite hedefleri gibi olasılıkları tahmin edilebilmektedir.

Akut toksisite modelleri, bilinen toksik etkileri olan bileşikler arasındaki kimyasal benzerliklere dayalı olarak oluşturulmaktadır. Toksisite hedeflerini tahmin etmek için Novartis in vitro güvenlik panellerinden advers ilaç reaksiyonlarıyla ilgili protein hedeflerinden 15 farklı hedef kullanılmaktadır. İlaça bağlı hepatotoksisite, akut karaciğer yetmezliğinin önemli bir nedenidir ve ilacın piyasadan çekilmesinin ana nedenleri arasındadır. İlaça bağlı karaciğer hasarı (DILI) kronik bir süreç ve nadir görülmesine rağmen, DILI' nin öngörülmesi ilaç geliştiriciler, düzenleyiciler ve klinisyenler için esastır. ProTox-II hepatotoksisite tahmin modeli, çapraz doğrulamada % 82 ve harici doğrulamada % 86 doğruluğa sahiptir.

Hücre DNA'sındaki değişiklikler gibi anormal genetik mutasyonlara neden olan kimyasallara mutajenler denir. Bu tür değişiklikler hücrelere zarar verebilir ve kanser gibi hastalıklara neden olabilir. Tümörleri indükleyebilen veya tümör insidansını artırabilen kimyasallara karsinogenler denir. ProTox-II kanserojenlik tahmin modeli, çapraz doğrulamada % 81.24 ve harici doğrulamada % 83.30 doğruluğa sahiptir.

ProTox-II, Ames testi ile mutajenite tahminine ve CEBS veri tabanından alınan verilere dayalı olarak çapraz doğrulamada % 84.00 ve harici doğrulamada % 85.00 doğruluğa sahiptir.

Sitotoksisite tahmini, istenmeyen veya istenen hücre hasarına neden olabilen bileşiklerin taranması için de çok önemlidir. ProTox-II sitotoksisite tahmin modeli, çapraz doğrulamada %85.00 ve harici doğrulamada % 83.60 doğruluğa sahiptir.

Ksenobiyotiklerin bağışıklık sistemi üzerindeki olumsuz etkisine immünotoksisite adı verilir ve ProTox-II immünotoksisite tahmin modeli çapraz doğrulamada % 74.00 ve harici doğrulamada % 70.00 doğruluğa sahiptir (Banerjee et al., 2018).

ProTox-II, bilinen akut toksisiteye sahip en benzer  bileşikle birlikte genel bir toksisite radar grafiği de göstermektedir. Böylece, diğer sunucularla karşılaştırıldığında, ProTox-II, kimyasal toksisitenin kapsamlı bir şekilde tahmin edilmesini sağlamaktadır (Jia, Li et al., 2020).





### 3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

#### 3.1.1 Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler Tablo 3.1’de verilmiştir.

**Tablo 3.1** Deneyler kapsamında kullanılan malzemeler

| Kimyasal Malzeme                                                                             | Marka                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Agar                                                                                         | Difco                 |
| D-biotin                                                                                     | Sigma Aldrich         |
| Diklorometan (DCM)                                                                           | Sigma Aldrich         |
| Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )    | Sigma Aldrich         |
| Dulbecco’s Modified Eagle Media (DMEM)                                                       | Sigma Aldrich         |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                                                                     | Biological Industries |
| Gliserin                                                                                     | Merck                 |
| Gliserol Monostearat                                                                         | BASF                  |
| Glisiriza kökünden (meyan kökü) glisirizik asit amonyum tuzu                                 | Sigma Aldrich         |
| İzopropil Miristat                                                                           | BASF                  |
| Kaprilik/Kaprik Trigliserit                                                                  | BASF                  |
| L-histidin                                                                                   | Sigma Aldrich         |
| Magnezyum klorür heksahidrat ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )                   | Sigma Aldrich         |
| Magnezyum sülfat heptahidrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )                   | Sigma Aldrich         |
| MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)                              | Biomatik              |
| Nutrient broth                                                                               | Oxoid                 |
| Penisilin-Streptomisin                                                                       | Biological Industries |
| Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)                                                         | Sigma Aldrich         |
| Polisorbat 60                                                                                | BASF                  |
| Polivinil alkol (PVA)                                                                        | Sigma Aldrich         |
| Potasyum fosfat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                                                 | Sigma Aldrich         |
| Potasyum klorür (KCl)                                                                        | Sigma Aldrich         |
| Setostearil Alkol                                                                            | BASF                  |
| Sitrik asit monohidrat ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )         | Sigma Aldrich         |
| Sodyum amonyum fosfat tetrahidrat ( $\text{NaNH}_4(\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O})$ ) | Sigma Aldrich         |
| Sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )   | Sigma Aldrich         |
| Sodyum hidroksit (NaOH)                                                                      | Sigma Aldrich         |
| Sodyum klorür (NaCl)                                                                         | Sigma Aldrich         |
| Tripsin- Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi                                      | Wisent INC            |
| 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür (MTT)                               | Biomatik              |
| 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD)                                                                | Sigma Aldrich         |

### 3.1.2 Cihazlar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan malzemeler Tablo 3.2’de verilmiştir.

**Tablo 3.2** Deneyler kapsamında kullanılan cihazlar

| Kullanılan Cihazlar                | Marka/Model                  |
|------------------------------------|------------------------------|
| CO <sub>2</sub> İnkübatörü         | Nuve/ EC 160                 |
| Çalkalamalı Su Banyosu             | Witeg/WITEG_20004            |
| Hücre Güvenlik Kabini              | Faguslab                     |
| Hassas Terazı-1                    | Ohaus/ PA214C                |
| Hassas Terazı-2                    | Mettler Toledo/XP5003SDR     |
| Homojenizatör                      | IKA-Ultra Turrax T25         |
| Liyofilizatör                      | Biobase/BK-FD10S             |
| Manyetik Karıştırıcı-1             | Dlab/MS-M-S10                |
| Manyetik Karıştırıcı-2             | Heidolph MR/ Hei-Standard    |
| pH-metre                           | Mettler Toledo/Seven Compact |
| Santrifüj                          | Hettich GmbH/ Universal 320  |
| Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) | EVO LS 10/ ZEISS             |
| Ultrasonik Sonikatör               | Bandelin Sonopuls HD2070     |
| UV Işık Spektrofotometre Cihazı    | Shimadzu UV-1280             |
| Viskozimetre                       | Brookfield DV2T              |
| Vorteks                            | BioCote                      |
| Zeta-Sizer                         | Malvern Zeta Sizer Nano ZS   |

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 GA Analitik Metot Geliştirme Çalışması

Etken madde olarak seçilen GA için analitik metot geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Çalışma kapsamında, 190-500 nm aralığında GA’ in maksimum absorbands verdiği dalga boyu tespit edilmiştir.

### 3.2.2 GA Analitik Validasyon Çalışması

Geliştirilen metot için analitik validasyon çalışmaları yürütülmüştür. Analitik validasyon çalışmaları kapsamında seçicilik, doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık analitik metot validasyon parametreleri ICH kılavuzlarına göre Ultraviyole- Görünür Bölge (UV-Vis) spektrofotometre kullanılarak analiz edilmiştir (Guideline, 2005).

Seçicilik parametresi için geliştirilen metodun GA için seçici bir yöntem olduğunu kanıtlamak için, çözelti olarak hazırlanan boş PLGA ve çözücü olarak kullanılan fosfat tamponu (PBS) pH=5.5'in UV-Vis spektrofotometre kullanarak 190-500 nm dalgaboyu spektrumları alınmıştır.

Doğrusallık parametresi için GA' in beş farklı konsantrasyonda stok çözeltileri (20.00 µg/mL, 30.00 µg/mL, 50.00 µg/mL, 55.00 µg/mL, 60.00 µg/mL) hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin UV-Vis spektrofotometre kullanılarak 258.2 nm dalgaboyunda absorbansları ölçülmüş, konsantrasyonlara karşı absorbans grafiği (kalibrasyon eğrisi) çizilmiştir.

Keskinlik parametresi için geliştirilen yöntem kullanılarak, gün içi keskinlik ve günler arası keskinlik olmak üzere iki farklı kategoride incelenmiştir.

Gün içi keskinlik çalışmaları için üç farklı konsantrasyonda (20.00 µg/mL, 55.00 µg/mL ve 60.00 µg/mL) GA çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin ardışık üç kez absorbansları ölçülmüştür. Her bir çözelti için % 95 güven aralığı (CF) ve % relatif standart sapma (% RSD) değerleri hesaplanmıştır.

Günler arası (ara keskinlik) çalışmaları için farklı günlerde, farklı analist tarafından 20.00 µg/mL, 55.00 µg/mL ve 60.00 µg/mL konsantrasyonlarında GA çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerin ardışık üç kez absorbansları ölçülmüştür. Her bir çözelti için % 95 CF ve % RSD değerleri hesaplanmıştır.

Doğruluk parametresi için standart ekleme yöntemi kullanılmıştır. Konsantrasyonu bilinen GA çözeltilerine, konsantrasyonları 50.00 µg/mL, 55.00 µg/mL ve 60.00 µg/mL olacak şekilde farklı miktarlarda GA ilave edilmiş, çözeltilerin absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Numune konsantrasyonları kalibrasyon eğrisi kullanılarak, hazırlanan her çözelti için hesaplanmıştır.

Sağlamlık parametresi için çözelti stabilitesi çalışması yapılmıştır. 60 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan çözelti 258.2 nm dalga boyunda 0., 24. ve 48. saatlerde analiz edilerek absorbansları ölçülmüştür.

### **3.2.3 Nanopartiküllerin Hazırlanması**

#### **3.2.3.1 GA Yüklü Nanoformülasyonunun Hazırlanması**

GA yüklü PLGA nanoformülasyonu çift emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Gutiérrez-Valenzuela, Esquivel et al., 2018; Budama-Kilinc, 2019). Bu bağlamda, 5 mg GA 1 mL suda çözündürülmüş ve ardından 20 mg PLGA içeren 2 mL DCM çözeltisine ilave edilmiştir. Daha sonra karışım, bir buz banyosunda ultrasonik sonikatör ile 3 dakika boyunca % 25 genlikte emülsifiye edilmiştir.

1 mg PVA, 20 mL distile su içerisinde çözündürülerek karışıma ilave edilmiştir. İkinci bir emülsifikasyon, buz banyosunda % 75 genlikte 3 dakika boyunca sonikasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Emülsifikasyondan sonra, DCM'nin solüsyondan uzaklaştırılması için flakonlar ağzları açık olarak manyetik karıştırıcı üzerinde gece boyu karıştırılmıştır.

Ertesi gün, GA yüklü PLGA nanoformülasyonunu içeren solüsyon, 8000 rpm'de 30 dk üç kez santrifüjlenmiştir. Ardından nanopartikül solüsyonu 0.45 µm selüloz membran filtreden geçirilmiş ve liyofilizatöre alınarak liyofilize edilmiştir (Gutiérrez-Valenzuela, Esquivel et al., 2018). Tüm deneyler üç kez tekrarlı olarak yapılmıştır.

#### **3.2.3.2 Boş PLGA Nanoformülasyonunun Hazırlanması**

Boş PLGA nanoformülasyonu çift emülsiyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Gutiérrez-Valenzuela, Esquivel et al., 2018; Budama-Kilinc, 2019). 20 mg PLGA içeren 2 mL DCM çözeltisine GA yerine 1 mL saf su eklenmiş, daha sonra karışım buz banyosunda ultrasonik sonikatör ile 3 dakika boyunca %25 genlikte emülsifiye edilmiştir.

1 mg PVA, 20 mL distile su içerisinde çözündürülerek, karışıma ilave edilmiştir. İkinci bir emülsifikasyon, buz banyosunda %75 genlikte 3 dk boyunca sonikasyon ile gerçekleştirilmiştir. Emülsifikasyondan sonra, DCM'nin solüsyondan uzaklaştırılması için flakonlar ağzları açık olarak manyetik karıştırıcı üzerinde gece boyu karıştırılmıştır.

Ertesi gün, GA yüklü PLGA nanoformülasyonunu içeren solüsyon, 8000 rpm'de 30 dk boyunca üç kez santrifüj edilmiştir.

Ardından nanopartikül solüsyonu 0.45  $\mu$ m selüloz membran filtreden geçirilmiş ve liyofilizatöre alınarak liyofilize edilmiştir. Tüm deneyler üç kez tekrarlı olarak yapılmıştır.

### **3.2.4 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun Karakterizasyonu**

#### **3.2.4.1 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi**

Dinamik ışık saçılım çalışma prensibi ile boş ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun ortalama partikül boyutu (Z-Ave), polidispersite indeksi (PdI), zeta potansiyeli (ZP), 4.0 MV He-Ne lazer ile donatılmış Zeta Sizer Nano ZS cihazı kullanılarak (633 nm, 25°C) belirlenmiştir. Ölçümler her bir örnek için üç kez tekrarlanarak gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.4.2 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi**

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun morfolojisi SEM cihazı kullanılarak belirlenmiştir. GA yüklü PLGA nanoformülasyon numunesi distile suda dağıtıldıktan sonra 45 dakika sonikasyon için ultrasonik banyoya yerleştirilmiştir. Ardından, 100  $\mu$ L nanoformülasyon numunesi cama damlatılmış ve oda sıcaklığında 6 saat kurutulmuştur. SEM görüntüleri 10.00 kV, 20.00 KX büyütme, 15.0 mm çalışma mesafesinde lens içi dedektör ile elde edilmiştir.

#### **3.2.4.3 Enkapsülasyon Verimliliği ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması**

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun içerisinde bulunan GA miktarı enkapsülasyon verimi değeri Denklem 3.1 kullanılarak, nanoformülasyonun içerisinde enkapsüle halde olan GA'nın ağırlıkça oranı ise yükleme kapasitesi değeri Denklem 3.2 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Enkapsülasyon Verimi} = \frac{\text{Toplam GA} - \text{Serbest GA}}{\text{Toplam GA}} \times 100 \quad (3.1)$$

$$\% \text{ Yükleme Kapasitesi} = \frac{\text{Enkapsüle olmuş GA miktarı}}{\text{GA yüklü PLGA nanoformülasyonun Ağırlığı}} \times 100 \quad (3.2)$$

#### 3.2.4.4 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun *In Vitro* Salım Analizi

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun *in vitro* salım profilini belirlemek için membran difüzyon tekniği kullanılmıştır (Ercin, Kecel-Gunduz et al., 2022). İnsan derisinin pH değeri 4.1–5.8 arasında olması sebebiyle salım ortamı için PBS pH=5.5 kullanılmıştır (Proksch, Soeberdt et al., 2019; Mehlich, Doberenz et al., 2021).

1 mg GA yüklü PLGA nanoformülasyonu 1 mL distile su içinde süspanse edilerek, diyaliz kapsüllerine konulmuş ve sonrasında 50 mL PBS pH=5.5 salım ortamına yerleştirilmiştir (Proksch, 2018). Hazırlanan örnekler 120 rpm’de yatay çalkalamalı su banyosunda 32 °C’ de inkübe edilmiştir. GA *in vitro* salım profili 1., 2., 3., 4., 5., 24. ve 48. saat zaman aralıkları ile UV-Vis spektrometre kullanılarak analiz edilmiştir. Salım ortamından 1’er mL örnek alınmış, yerine aynı hacimde taze salım ortamı eklenmiştir. Deneyler üç tekrarlı olarak yürütülmüştür. Analizler sonrası cihazdan okunan absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak salım profili oluşturulmuş, Denklem 3.3 kullanılarak salım yüzdesi hesaplanmıştır.



Şekil 3.1 GA yüklü PLGA nanoformülasyonu *in vitro* salım çalışması

$$\% \text{ Salım} = \frac{\text{Ortamdaki GA Miktarı}}{\text{Toplam GA Miktarı}} \times 100$$

(3.3)

### 3.2.5 Genotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi

GA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun genotoksisiteleri, *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak Ames testi ile değerlendirilmiştir (Maron and Ames 1983). GA yüklü PLGA nanoformülasyonu konsantrasyonları 0.125, 0.25, 0.5, 1 mg/mL olarak, GA konsantrasyonları ise yükleme kapasitesi değerine göre belirlenmiştir. Deneylerde, negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılmıştır. 0.1 mL bakteri kültürü ( $1-2 \times 10^9$ ) ve test numunesi üst agara ilave edilip vorteksleme işleminden sonra minimal glukoz agar (MGA) plakasının yüzeyine dökülmüş, plakalar 37 °C' de 48 saat inkübe edilmiştir. Test örneklerine paralel olarak negatif kontrol, spontan kontrol ve pozitif kontrol TA98 (4-nitro-o-fenilendiamin) ve TA100 (sodyum azid) için plakalar hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrasında GA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun genotoksisiteleri, GA ve nanoformülasyonun oluşturduğu geri dönen kolonilerin sayısı ile negatif plaklarda oluşan kolonilerin sayısı karşılaştırılarak Mortelman and Zeiger'e göre ve SPSS 22 for Windows paket programında Tukey testi ile  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir. Deneyler, her bir örnek için üç kez tekrarlı olarak yapılmıştır.

### 3.2.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

#### 3.2.6.1 Hücrelerin Çözdürülmesi

Sıvı azot tankından çıkartılan dondurulmuş kriyotüpler, HaCaT hücre hattının çözdürülmesi için 37 °C' de sıcak su banyosunda çözdürülmüştür. Su banyosundan alınan kriyotüpler kurulanıp alkolle silindikten sonra laminar akım kabiniinde 5 mL besiyeri bulunan santrifüj tüpünün içerisine aktarılmıştır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır.

Hücre peleti üzerine 2 mL besiyeri konulduktan sonra pipetleme yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu T25 flaska aktarılmış, üzerine 3 mL daha besiyeri eklenmiştir. Ardından, hücreler CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.2.6.2 Hücrelerin Pasaj İşlemi

T25 flaskta bulunan HaCaT hücrelerinin flask yüzeyini kaplama miktarı, 1-2 gün aralıklarla ters mikroskop ile kontrol edilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyini en az % 80-90 yoğunlukta kapladığı gözlemlendiğinde pasajlama işlemi yapılmıştır.

Hücreler % 80-90 yoğunluğa geldiğinde inkübatörden alınmış ve üzerindeki sıvı döküldükten sonra PBS pH=7.4 ile yıkanmıştır. Hücreleri flasktan kaldırmak için 1 mL Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve 5 dk süreyle % 5' lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda HaCaT hücrelerine 5 mL besiyeri (%89 DMEM, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin) eklenerek tripsin aktivitesi durdurulmuştur. Elde edilen hücre süspansiyonu 15 mL'lik falkon tüpe aktarılmış ve 1500 rpm' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda pellete besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılarak homojenizasyon sağlanmıştır. Hücreler 1-2 x 10<sup>5</sup> hücre/mL olacak şekilde 25 cm<sup>2</sup> lik ve 75 cm<sup>2</sup> lik flasklara ekilerek 37 °C' de % 5' lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe çoğalmaya bırakılmıştır.

### 3.2.6.3 Hücrelerin Dondurularak Saklanması

HaCaT hücreleri 1 mL'lik Tripsin-EDTA ile kaldırılarak toplanmıştır. Ardından 5 mL besiyeri eklenmiş ve 15 mL' lik falkonlara alınmıştır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra pellet üzerindeki sıvı atılarak yeni besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır. Kriyotüplere 1x10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde, 900 µL FBS ve 100 µL DMSO eklendikten sonra kriyotüpler hızlıca -20 °C' ye kaldırılmıştır. Kriyotüpler -20 °C' de 1 saat bekletildikten sonra -80 °C' ye alınmış, yaklaşık olarak 24 saat bekletildikten sonra sıvı azot tankının içerisine konulmuştur.

### 3.2.6.4 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun Sitotoksitesinin Belirlenmesi

HaCaT hücre hattı 1 mL besiyerinde (% 89 DMEM, % 10 FBS, % 1 Penisilin-Streptomisin) 10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuk için nihai yoğunluğu 1 x 10<sup>4</sup> olan 100 uL hücre çözeltisi, 96 kuyucuklu mikrolakaya ekilmiştir. Plakalar, hücre büyümesi için 37 °C' de % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde yüzey kaplaması için 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, kuyucuklardan kültür ortamı çıkartılmıştır.



GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun konsantrasyonları 0.0625 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL ve 4.0 mg/mL olacak şekilde, GA konsantrasyonu ise yükleme kapasitesine göre belirlenerek, her kuyuya eşit hacimlerde (100 µL) eklenmiştir. Kontrol kuyucuklarına 100 µL besiyeri eklenmiş ve kuyucuklar 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat inkübasyon sonunda ortam, 5 mg/mL MTT ile değiştirilip 4 saat inkübe edilmiştir. Ardından 100 µL DMSO ilave edilmiştir. Bir mikropılaka okuyucu ile absorbanı dalgaboyu 570 nm' ye ayarlanıp ölçümler yapılmıştır. Hücre canlılığının yüzdesi Denklem 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı \%} = \frac{\text{Numune optik yoğunluğu}}{\text{Kontrolün optik yoğunluğu}} \times 100 \quad (3.4)$$

### 3.2.7 *In Silico* Analizleri

*In silico* çalışmalar GA'in anti-aging etkisini belirlemek amacıyla bilgisayar hesaplama yöntemlerinden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, GA ve MMP' lar arasındaki doğrudan etkileşimler ve bağlayıcı afineteler moleküler kenetlenme çalışması ile belirlenmiş, MD çalışması ile GA-MMP komplekslerinin inhibisyon profilleri ve yapı stabiliteleri açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiş, son olarak da GA' in ADMET özellikleri belirlenmiştir.

#### 3.2.7.1 Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

GA'in moleküler yapısı PubChem veri tabanından (CID:14982) alınmıştır (Kim et al., 2021). Kollajenaz-1 matris metalloproteinaz-1 (MMP-1) (pdb:966C) (Lovejoy, Welch et al. 1999), matris metalloproteinaz-3 (MMP-3) (pdb:2JT6) (Alcaraz, Banci et al. 2007), ve matris metalloproteinaz-9 (MMP-9) (pdb:5CUH) (Camodeca, Nuti et al. 2016), RCSB protein veri bankasından üç boyutlu kristal yapı alınarak bir dizi MMP hazırlanmıştır (RCSB, 2022; Burley, Bhikadiya et al., 2021). Ligand ve reseptör yapılarının minimizasyonu, ligand ve reseptör hazırlığı kullanılarak moleküler kenetlenme analizi yapılmadan önce uygulanmıştır.

Moleküler kenetlenme analizi, GA ve MMP' lar arasındaki doğrudan etkileşimleri ve bağlayıcı afinitelerini araştırmak için Schrödinger Software Maestro sürüm 11.4'ün (Friesner et al., 2004; Halgren et al., 2004; Friesner et al., 2006) Glide SP modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7.2 Moleküler Dinamik Analizleri**

GA-MMP kompleksleri MD çalışması için kenetlenme sonuçlarından alınmıştır. Kompleksler, inhibisyon profilleri ve yapı stabiliteleri açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. MD simülasyonları, Schrödinger programının Desmond simülasyon paketi kullanılarak yapılmıştır (Bowers, Chow et al. 2006; Release, 2017).

Tüm sistemler, bir TIP3P su molekülü modeli içeren kübik bir kutu kullanılarak çözülmüş ve sistemin net yükünü nötralize etmek için  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$  iyonları eklenmiştir. 1 bar basıncı ve 300 K sıcaklığı korumak için NPT topluluğu uygulanmış ve tüm sistemler 50 ns için son MD simülasyonlarına tabi tutulmuştur.

Farklı MD yörüngelerini analiz etmek için Schrödinger programının Desmond simülasyon paketi tarafından sağlanan araçlar kullanılmıştır. MMP' ların yapıları ve üç GA-MMP kompleksi, kök-ortalama-kare sapma (RMSD) analizi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

Simülasyonlar içindeki kalıntı hareketliliği ve stabilitesindeki farklılıkların ayrıntılı resmi, ortalama yapıya göre  $\text{C}\alpha$  atomlarının ve yan zincirin ortalama kare dalgalanmalarının (RMSF) grafiklerinden elde edilmiştir. Protein-Ligand temasları ve etkileşimleri analiz edilmiş, temas süreleri ve temas bölgeleri ile verilmiştir.

### **3.2.7.3 Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım ve Toksisite (ADMET) Çalışması**

GA'nin fizikokimyasal ve farmakokinetik özellikleri, lipofiliklik, suda çözünürlük ve ilaç benzerliği özellikleri Molinspiration (Molinspiration, 2022) ve SwissADME sunucusu (Daina, Michielin et al., 2017) ile tahmin edilmiştir. ADMET özellikleri ise pkCSM (Pires, Blundell et al., 2015) ve ProTox-II (Banerjee, Eckert et al., 2018) sunucuları kullanılarak detaylı olarak analiz edilmiştir.

### 3.2.8 Nihai Formülasyon Çalışmaları

#### 3.2.8.1 Nanoformülasyon İçermeyen Kremlerin Hazırlanması

Uygun krem formülasyonunun seçilmesi amacıyla formülasyon çalışmalarının ilk adımında GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içermeyen (plasebo) kremler hazırlanmıştır.

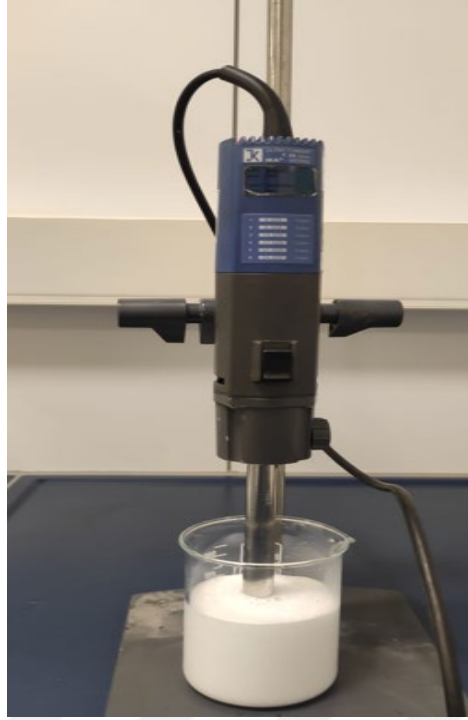
Bu kapsamda, 100'er g' lık plasebo kremler hazırlanmış, formülasyonlarda kullanılan hammadde miktarları Tablo 3.3' de verilmiştir.

**Tablo 3.3** Formülasyonda kullanılan hammaddeler ve fonksiyonları

| Hammadde                        | F1   | F2   | F3   | F4   | F5   |
|---------------------------------|------|------|------|------|------|
| Kaprilik/Kaprik Trigliserit (g) | 11.5 | 11.3 | 11.3 | 10.5 | 10.5 |
| İzopropil Miristat              | 1.3  | 1.5  | 1.5  | 1.5  | 1.5  |
| Gliserin (g)                    | 3.3  | 4.5  | 7.5  | 7.5  | 8.3  |
| Gliserol Monostearat (g)        | 2.5  | 2.5  | 2.5  | 2.5  | 2.5  |
| Polisorbat 60 (g)               | 4.2  | 4.2  | 4.2  | 5.0  | 5.0  |
| Setostearil Alkol (g)           | 7.0  | 7.0  | 7.0  | 7.0  | 7.0  |
| Saf su (g)                      | 70.2 | 69.0 | 66.0 | 66.0 | 65.2 |
| <b>Toplam (g)</b>               | 100  |      |      |      |      |

Her bir formülasyon için aşağıda verilen adımlar sıra ile uygulanmıştır.

1. Faz A (Yağ) – Kaprilik/Kaprik Trigliserit, İzopropil Miristat, Gliserol Monostearat, Polisorbat 60, Setostearil Alkol uygun boyutta bir cam beher içine karıştırma ve ısıtma işlemleri devam ederken eklenmiş, karışım 70-80°C' ye ısıtılmıştır.
2. Faz B (Su) – Saf su ve gliserin, uygun boyutta bir cam beher içine karıştırma ve ısıtma işlemleri devam ederken eklenmiş, karışım 70-80°C' ye ısıtılmıştır.
3. Faz B, Faz A'nın üzerine homojenizatör çalıştırılırken eklenmiştir. Karışım sıcaklığı 30°C' ye düşene kadar karıştırma işlemine devam edilmiş, daha sonra krem soğumaya bırakılmıştır.



**Şekil 3.1** Faz A ve Faz B'nin homojenizasyon işlemi

Üretilen kremlerin, görünüş, sürülebilirlik, pH ve faz ayrımı özellikleri incelenmiştir. En uygun özellik gösteren F-5 formülasyonu, GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren kremlerin hazırlanması için referans formülasyon olarak seçilmiştir.

#### **3.2.8.2 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonu İçeren Krem Formülasyonların Hazırlanması**

Plasebo olarak kullanılmak üzere F-5 formülasyonu tekrar hazırlanmıştır. Paralel olarak 0.25 mg/mL ve 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan kremler stabilite kabinlerine alınacağı için bu kez 200 g'lık kremler hazırlanmıştır. Bu kapsamda hazırlanan kremlerin bileşenleri Tablo 3.4' de verilmiştir.

**Tablo 3.4** Nihai formülasyonlara ait seri formüller

| Hammadde                            | Plasebo | A    | B    |
|-------------------------------------|---------|------|------|
| Kaprilik/Kaprik Trigliserit (g)     | 21.0    | 21.0 | 21.0 |
| İzopropil Miristat (g)              | 3.0     | 3.0  | 3.0  |
| Gliserin (g)                        | 16.6    | 16.6 | 16.6 |
| Gliserol Monostearat (g)            | 5.0     | 5.0  | 5.0  |
| Polisorbat 60 (g)                   | 10.0    | 10.0 | 10.0 |
| Setostearil Alkol (g)               | 14.0    | 14.0 | 14.0 |
| GA yüklü PLGA nanoformülasyonu (mg) | -       | 49.0 | 98.0 |
| Saf su (g)                          | k.m.    | k.m. | k.m. |
| HCl                                 | k.m.    | k.m. | k.m. |
| NaOH                                | k.m.    | k.m. | k.m. |
| <b>Toplam</b>                       | 200 gr  |      |      |

**A:** 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

**B:** 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

1. Faz A (Yağ) – Kaprilik/Kaprik Trigliserit, İzopropil Miristat, Gliserol Monostearat, Polisorbat 60, Setostearil Alkol uygun boyutta bir cam beher içine karıştırma ve ısıtma işlemleri devam ederken eklenmiş, karışım 70-80 °C' ye ısıtılmıştır.

2. Faz B (Su) – Uygun boyutta bir beher içine su ve gliserin karıştırma ve ısıtma işlemleri devam ederken eklenmiş, karışım 70-80 °C'ye ısıtılmıştır.

3. Faz C- GA-PLGA NP bir miktar suda karıştırılarak disperse edilmiş, sıcaklığı 45-50 °C olacak şekilde ısıtılmıştır.

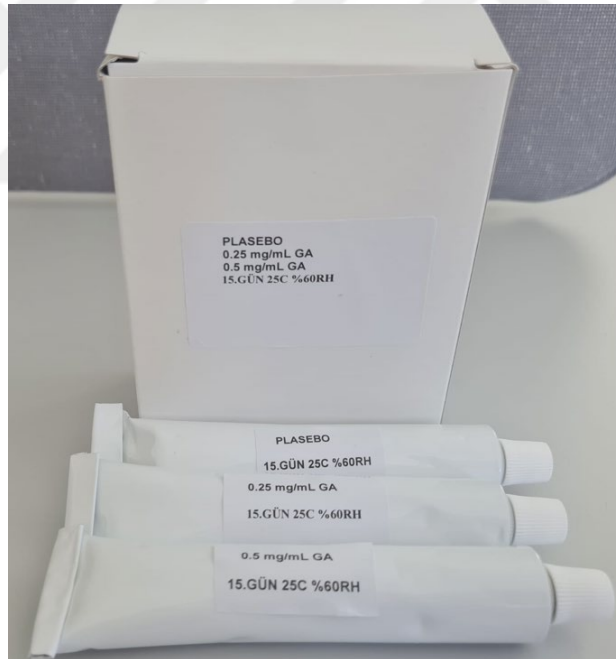
4. Faz B, Faz A'nın üzerine homojenizatör çalıştırılırken eklenmiştir. Karışım sıcaklığı 45-50 °C' ye düşene kadar karıştırma işlemine devam edilmiştir.

5. Ardından Faz C, 4 numarada belirtilen karışıma homojenizatör çalıştırılırken eklenmiştir.

6. Oluşan krem oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ardından alüminyum tüplere kremlerin dolum işlemi yapılmıştır.

### 3.2.9 Stabilite Çalışmaları

Hazırlanan kremlerin alüminyum tüpler içersine 30' ar g' lık dolunları yapılmıştır. Ardından alüminyum tüpler, karton kutular içersinde  $5 \pm 3$  °C,  $25 \pm 2$  °C % 60 RH,  $40 \pm 2$  °C % 75 RH koşullarına 15.gün, 1.ay, 3.ay zaman periyotlarına başlangıç analizlerinin tekrarlanması için kaldırılmıştır.



**Şekil 3.3** Numunelerin stabiliteye alınma şekilleri

### 4.1 GA Analitik Validasyon Çalışmaları

GA' in maksimum absorbans verdiği dalga boyu UV-Vis spektrofotometre ile Tablo 4.1' de sunulduğu üzere 258.2 nm olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4.1** GA' in 190-500 nm aralığında UV spektrumu

| No. | Dalgaboyu nm ( $\lambda$ ) | Absorbans |
|-----|----------------------------|-----------|
| 1   | 450.40                     | 0.010     |
| 2   | 258.20                     | 0.811     |
| 3   | 195.60                     | 2.721     |
| 4   | 467.80                     | 0.006     |
| 5   | 219.80                     | 0.274     |

GA stok standart çözeltisi 258.2 nm dalgaboyunda absorbans verirken, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3' de sunulduğu üzere boş PLGA çözeltisinin ve PBS pH=5.5' un aynı dalgaboyunda absorbans vermediği gözlemlenmiştir. Böylece, GA için seçilen dalgaboyu 258.2 nm için metodun seçici olduğu kanıtlanmıştır.

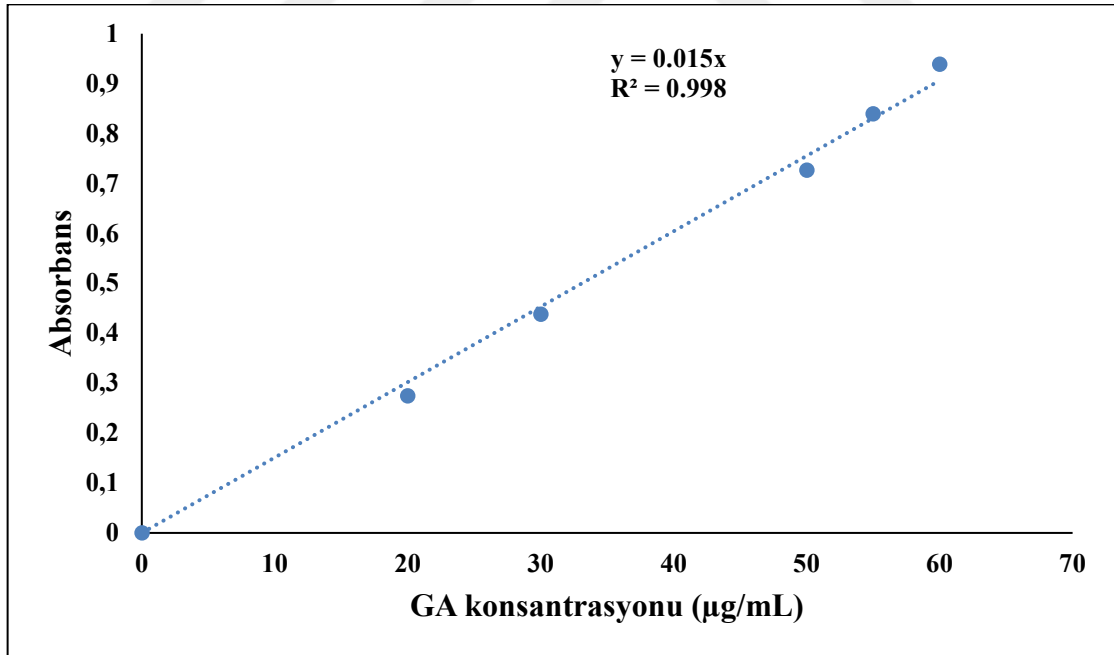
**Tablo 4.2** Boş PLGA çözeltisinin 190-500 nm aralığında UV spektrumu

| No. | Dalgaboyu ( $\lambda$ ) (nm) | Absorbans |
|-----|------------------------------|-----------|
| 1   | 196.80                       | 3.893     |

**Tablo 4.3** PBS 'in 190-500 nm aralığında UV spektrumu

| No. | Dalgaboyu ( $\lambda$ ) (nm) | Absorbans |
|-----|------------------------------|-----------|
| 1   | 476.20                       | -0.026    |
| 2   | 195.60                       | 2.441     |
| 3   | 468.60                       | -0.027    |
| 4   | 338.60                       | -0.021    |

Doğrusallık çalışması kapsamında, hazırlanan GA stok çözeltilerinin 258.2 nm dalgaboyunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak Şekil 4.1'de sunulan kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Elde edilen kalibrasyon eğrisinden eğim (m) = 0.015 olarak belirlenmiştir. Korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) = 0.998 olarak hesaplanmış ve  $R^2 > 0.99$  koşulunu sağlandığından metodun doğrusallığı kanıtlanmıştır.



**Şekil 4.1** GA kalibrasyon eğrisi



Kesinlik çalışması kapsamında, yapılan ölçüm sonuçları için % RSD değerleri hesaplanmıştır. Tablo 4.4’ de verildiği üzere, gün içi ve günler arası analizlerine ait 6 ölçüm arasındaki % RSD < % 2.0 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Tablo 4.5’ de sunulduğu üzere gün içi ve günler arası kesinlik parametresi için yapılan ölçümler için % RSD < % 2.0 olarak hesaplanmış ve metodun kesinliği kanıtlanmıştır.

**Tablo 4.4** Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçlarının karşılaştırılması

| Örnek Sayısı | 20.00 µg/mL | 55.00 µg/mL | 60.00 µg/mL |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| 1            | 0.275       | 0.840       | 0.935       |
| 2            | 0.273       | 0.839       | 0.933       |
| 3            | 0.275       | 0.844       | 0.932       |
| 4            | 0.274       | 0.840       | 0.931       |
| 5            | 0.273       | 0.840       | 0.926       |
| 6            | 0.274       | 0.841       | 0.931       |
| Ortalama     | 0.274       | 0.841       | 0.931       |
| SD           | 0.001       | 0.002       | 0.003       |
| % RSD        | 0.326       | 0.208       | 0.361       |
| % 95 CF      | 0.001       | 0.001       | 0.003       |

**Tablo 4.5** Gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları

| Parametre             | 20.00 µg/mL | 55.00 µg/mL | 60.00 µg/mL |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| Gün içi kesinlik      | 0.274±0.001 | 0.841±0.002 | 0.933±0.001 |
| Günler arası kesinlik | 0.274±0.001 | 0.841±0.002 | 0.933±0.001 |
| %RSD                  | 0.326       | 0.208       | 0.361       |

Doğruluk çalışması için hazırlanan çözeltilerin geri kazanım sonuçları Tablo 4.6’da sunulduğu üzere % 90.0-% 110.0 aralığında ve % RSD < % 2.0 olarak hesaplanmış, metodun doğruluğu kanıtlanmıştır.

**Tablo 4.6** Geri kazanım çalışması sonuçları

| <b>Eklenen Konsantrasyon<br/>(<math>\mu\text{g}</math>)</b> | <b>Geri Kazanım<br/>(%)</b> | <b>% RSD</b> |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------------|
| 30.01                                                       | 100.0 $\pm$ 0.29            | 0.26         |
| 34.99                                                       | 100.1 $\pm$ 0.27            | 0.24         |
| 40.00                                                       | 100.0 $\pm$ 0.12            | 0.11         |

Sağlamlık parametresi kapsamında hazırlanmış olan 60.00  $\mu\text{g/mL}$  çözeltinin 258.2 nm dalga boyunda, Tablo 4.7’ de sunulan, 0.saat, 24.saat ve 48. saatte ölçülen absorbansları ile çözeltinin 48 saat boyunca stabil olduğu kanıtlanmıştır.

**Tablo 4.7** Zamana bağlı absorbans değişimi

| <b>Zaman (Saat)</b> | <b>Absorbans</b>  | <b>% Değişim</b> |
|---------------------|-------------------|------------------|
| 0                   | 0.940 $\pm$ 0.002 | -                |
| 24                  | 0.932 $\pm$ 0.001 | 99.1             |
| 48                  | 0.935 $\pm$ 0.002 | 99.5             |

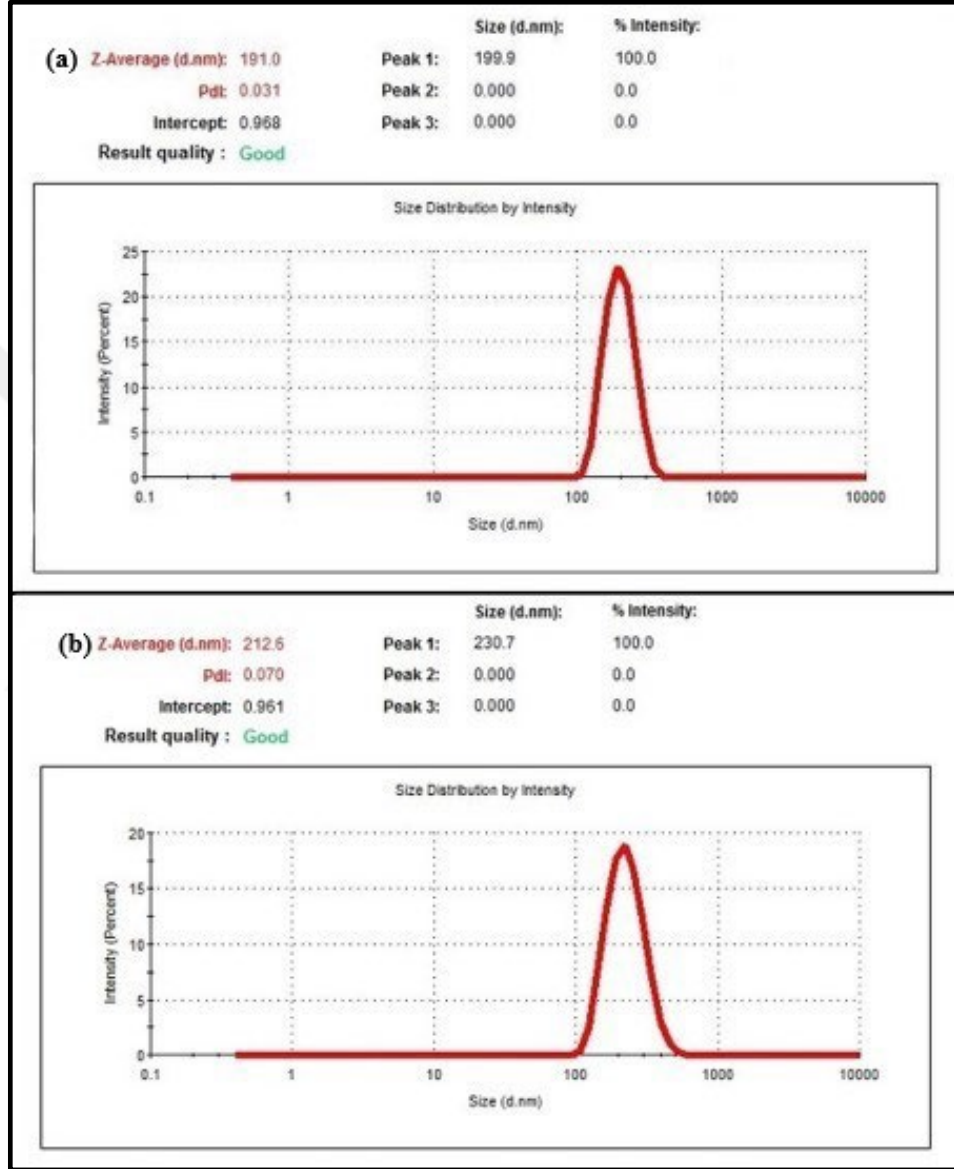
## 4.2 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun Karakterizasyon Sonuçları

### 4.2.1 DLS Analizi

Dinamik ışık saçılması tekniği, nanoformülasyonlarının boyut dağılım profilini belirlemek için kullanışlı bir yöntemdir. Bu yöntemle kolloidal sistemin kararlılığını tahmin etmek mümkündür (Maguire ve diğerleri, 2018, Wilson, Prud'homme, 2021). Z-Ave ve Pdl sonuçları boş PLGA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonları için Tablo 4.8 ve Şekil 4.2’ de verilmiştir.

**Tablo 4.8 Z-Ave ve Pdl ölçüm sonuçları**

|                                | Z-Ave (nm)    | PdI           |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| Boş PLGA nanoformülasyonu      | 191.0 ± 2.41  | 0.031 ± 0.017 |
| GA yüklü PLGA nanoformülasyonu | 212.6 ± 2.892 | 0.070 ± 0.042 |

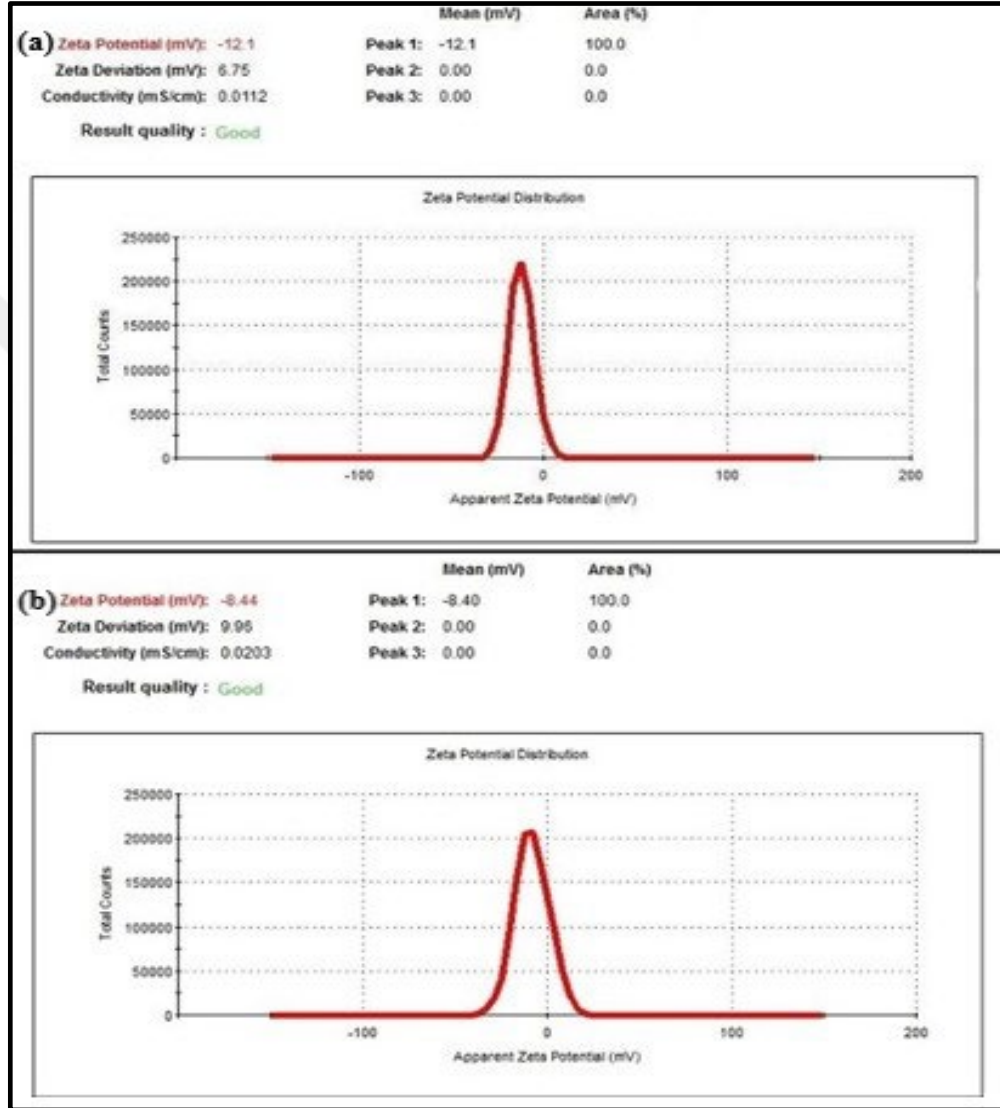


**Şekil 4.2 a) Boş PLGA ve b) GA yüklü PLGA nanoformülasyonuna ait Z-Ave ve Pdl sonuçları**

ZP değerlerinin sonuçları boş PLGA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonları için Tablo 4.9 ve Şekil 4.3' de verilmiştir.

Tablo 4.9 ZP ölçüm sonuçları

|                                | ZP (mV)        |
|--------------------------------|----------------|
| Boş PLGA nanoformülasyonu      | -12.10 ± 0.208 |
| GA yüklü PLGA nanoformülasyonu | -8.44 ± 0.525  |



Şekil 4.3 a) Boş PLGA ve b) GA yüklü PLGA nanoformülasyonuna ait ZP sonuçları

#### 4.2.2 SEM Analiz Sonuçları

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun morfolojisi ve partikül boyutu SEM cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

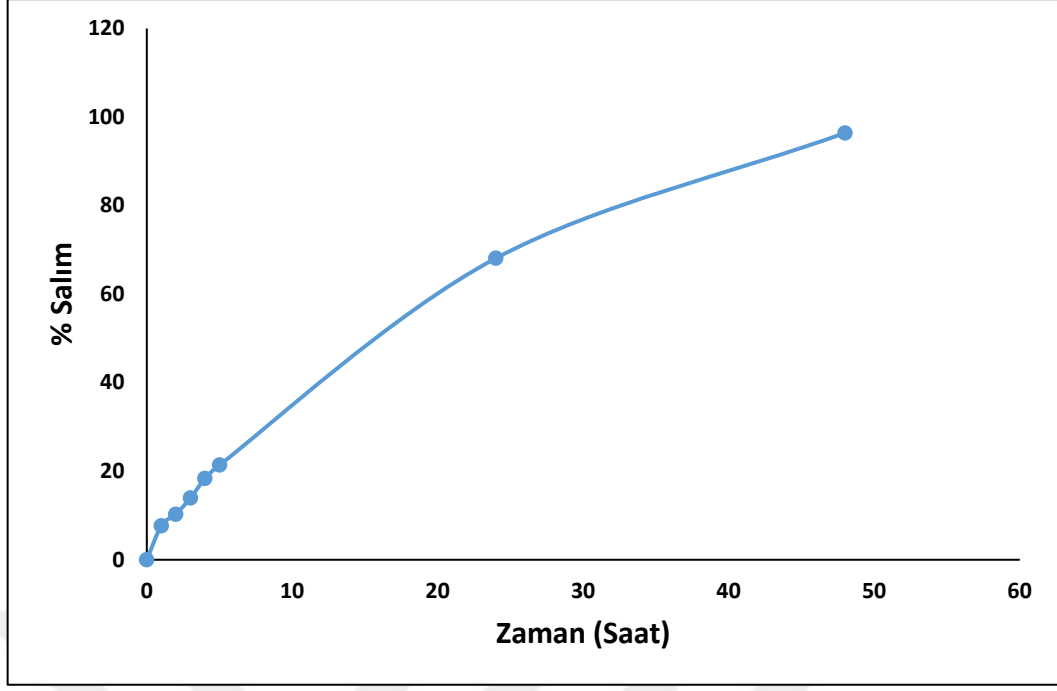
(a) SEM image of the ZnO film surface. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ . EHT = 10.00 kV, WD = 15.0 mm, Mag = 20.00 KX, Signal A = SE1.

(b) SEM image of the ZnO film surface with height measurements. Scale bar: 2  $\mu\text{m}$ . EHT = 10.00 kV, WD = 15.0 mm, Mag = 20.00 KX, Signal A = SE1. Height measurements (nm): 104.1, 106.1, 108.4, 109.4, 110.2, 123.8, 139.4, 139.7, 142.7, 150.4, 159.7.

### **İnkapsülasyon Verimi ve Yükleme Kapasitesinin Hesaplanması**

#### 4.2.4 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonunun *In Vitro* Salım Analizi Sonuçları

Şekil 4.5' de gösterilen GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun in vitro salım çalışması sonuçlarına göre GA'in % 21.4' ünün ilk 5 saat içinde, % 67.1' inin 24 saat içinde ve % 96.4' ünün 48 saat içinde salındığı görülmüştür.



Şekil 4.5 GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun *in vitro* salım grafiği

### 4.3 Genotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun genotoksik özelliklerini belirlemek için *S.typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak nanoformülasyonun 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL konsantrasyonlarına ve GA'in 0.219 mg/mL, 0.438 mg/mL, 0.875 mg/mL, 1.750 mg/mL konsantrasyonlarına Ames testi uygulanmıştır. Tablo 4.10' da sunulan sonuçlarla birlikte, Mortelman ve Zeiger (Mortelmans ve Zeiger, 2000) tarafından belirlenen yöntem ve istatistiksel analize göre GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun bu konsantrasyonları için genotoksik etkileri olmadığı belirlenmiştir ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 4.10** GA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun *S.typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları üzerindeki genotoksik etkileri

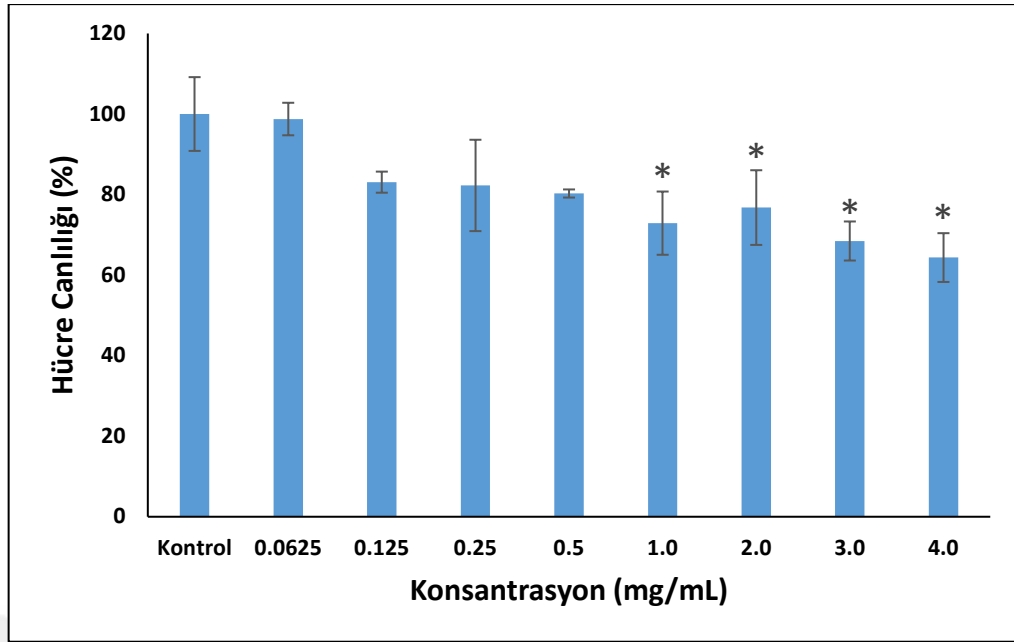
| Uygulama                          | Konsantrasyonlar<br>(mg/mL) | Geri Dönen Koloni Sayısı/Plak |               |
|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------|
|                                   |                             | TA98                          | TA100         |
|                                   |                             | Ortalama±SD                   | Ortalama±SD   |
| GA                                | 0.219                       | 30.33± 2.51                   | 114.00 ±28.21 |
|                                   | 0.438                       | 27.33± 2.45                   | 97.00±19.67   |
|                                   | 0.875                       | 27.66± 2.31                   | 105.33±13.31  |
|                                   | 1.750                       | 25.66 ± 2.08                  | 95.66±6.42    |
| GA Yüklü PLGA<br>Nanoformülasyonu | 0.125                       | 30.00± 2.00                   | 104.66±13.31  |
|                                   | 0.25                        | 32.66 ± 1.52                  | 110.00 ±21.93 |
|                                   | 0.50                        | 26.00± 3.00                   | 103.33±20.81  |
|                                   | 1.00                        | 32.00±1.00                    | 125.33±4.50   |
| Pozitif Kontrol (NPD)             | 0.005                       | 897.66± 5.87*                 |               |
| Pozitif Kontrol (SA)              | 0.0005                      |                               | 990.66±9.71*  |
| Negatif Kontrol                   |                             | 27.00±2.64                    | 100.66±10.06  |
| Spontan Kontrol                   |                             | 22.66± 3.05                   | 102.66±2.51   |

\*Negatif kontrol ve uygulama grupları arasındaki ortalama geri dönen koloni sayısı farkı,  $p < 0.05$  düzeyinde anlamlıdır.

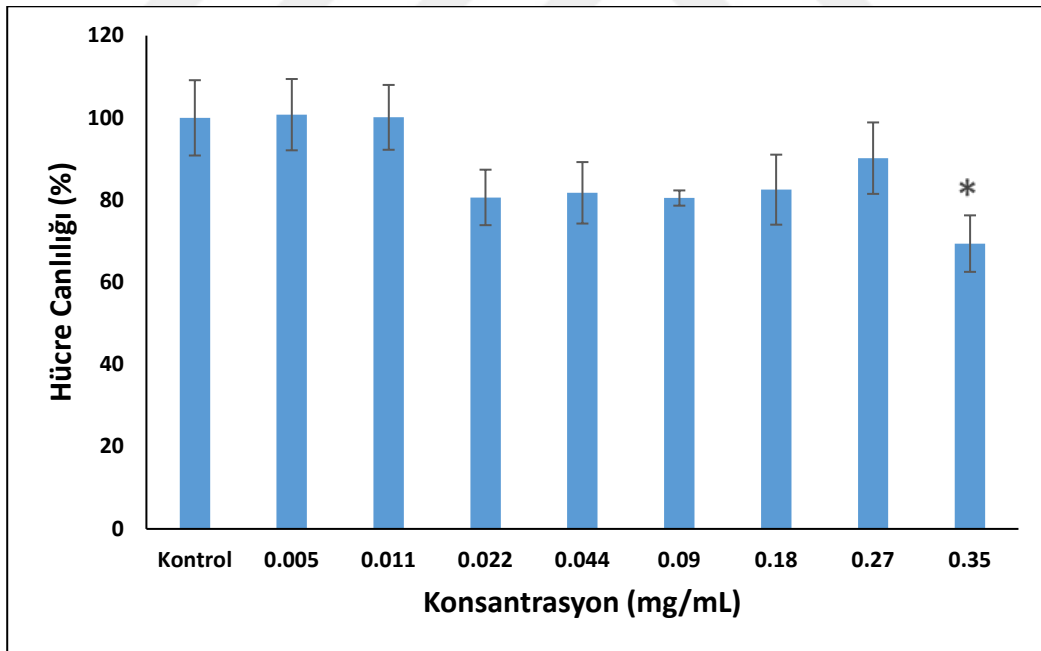
#### 4.4 Sitotoksitenin Belirlenmesi

GA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonun sitotoksiteleri HaCaT hücre hattı üzerinde incelenmiştir. GA yüklü PLGA nanoformülasyonunu için hücre canlılığı değerinin, konsantrasyon arttıkça kontrol grubuna göre azalmaya başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6). Aynı durum, konsantrasyonları yükleme verimliliği ile belirlenen GA' de gözlenmiştir (Şekil 4.7).

Uluslararası Standartlar Organizasyonu (ISO) 10993-5 değerlendirmesine göre, GA yüklü PLGA nanoformülasyonunu 0.5 mg/mL konsantrasyonunun sitotoksik olmadığı, 0.5 mg/mL üzerindeki konsantrasyonlarının (1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL ve 4.0 mg/mL) düşük toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.6** HaCaT hücre hattında GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun hücre canlılığı analizi  
(\*Kontrol ve tedavi grupları arasında önemli fark anlamına gelir)



**Şekil 4.7** HaCaT hücre hattında GA'in hücre canlılığı analizi  
(\*Kontrol ve tedavi grupları arasında önemli fark anlamına gelir)



## 4.5 *In silico* Çalışmalar

### 4.5.1 Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

UVB kaynaklı aşırı ROS üretiminin tetiklenmesi ve HaCaT hücrelerinde prokollajen bozulmasına neden olan MMP' ların (MMP-1, -3 ve -9) sayılarının arttırılması, moleküler kenetlenme çalışmalarında MMP'ların hedef olarak kabul edilmesini sağlamıştır.

GA ve MMP-1, -3 ve -9 arasında hesaplanan kenetlenme enerji değerleri sırasıyla -8.26, -4.57 ve -8.64 kcal/mol olarak bulunmuş; GA ve MMP-1, -3 ve -9 arasındaki tüm olası hidrojen (H) bağı etkileşimleri, tuz köprüsü etkileşimleri, metal koordinasyon etkileşimleri ve aromatik H bağı etkileşimleri Tablo 4.11' de sunulmuştur.

MMP-1'deki H bağı etkileşimindeki kalıntıları ASN180 (2.04 Å), LEU181 (2.08 Å), GLU219 (1.62 Å) ve TYR240 (2.41 Å)'dır. GA'deki hidroksi grubu ile karboksil grubundaki O atomu ve MMP-1'deki Zn atomu arasında hem tuz köprüsü etkileşimi (2.06 Å) hem de metal koordinasyon etkileşimleri (2.06 Å ve 2.27 Å) meydana gelmiştir.

**Tablo 4.11.** GA ve MMP hedefleri arasındaki moleküler kenetlenme enerjileri ve olası etkileşimler

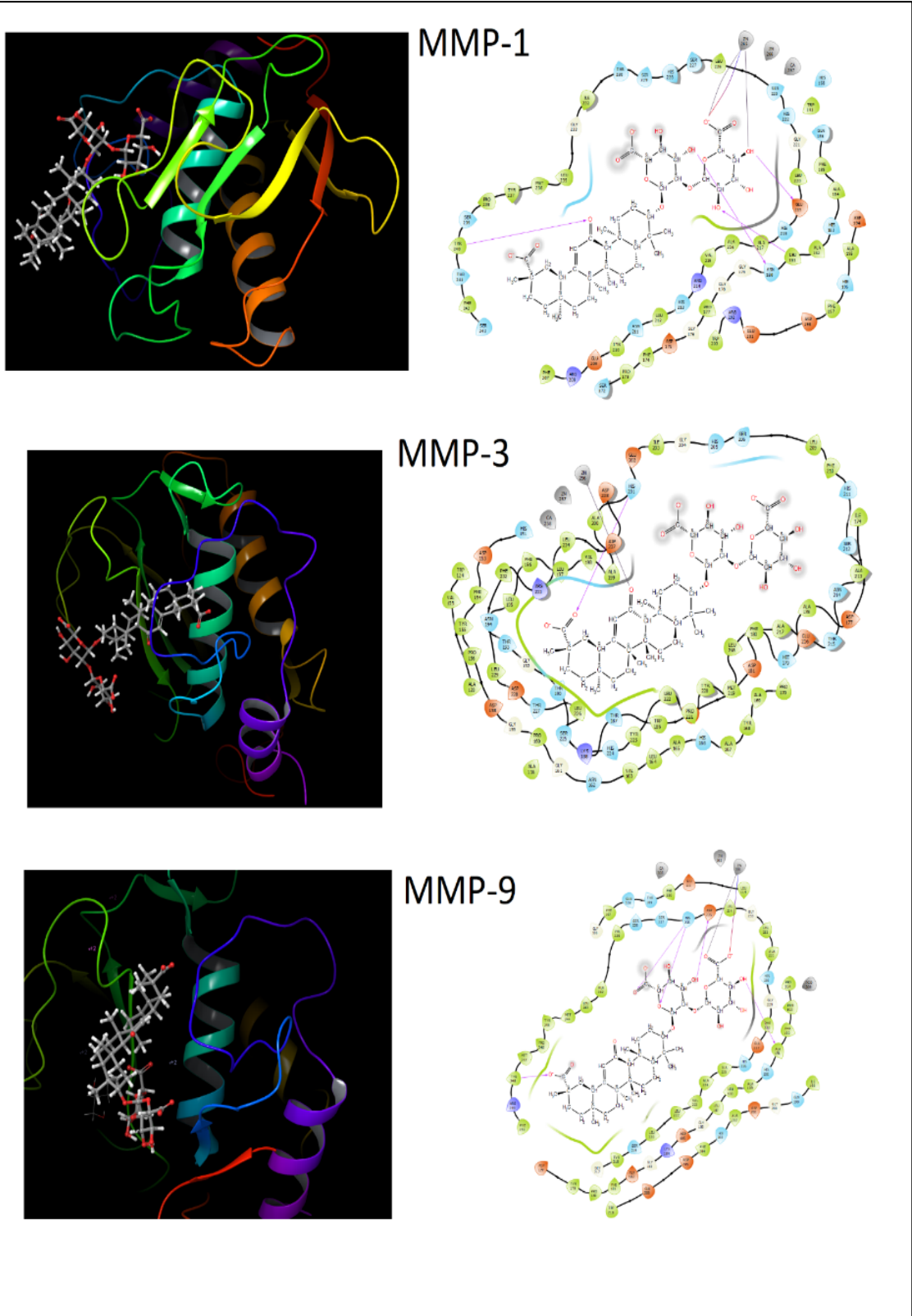
|                                     | MMP-1                                                        | MMP-3                        | MMP-9                                                                        |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
|                                     | PDB ID:966c                                                  | PDB ID:2JT6                  | PDB ID:5CUH                                                                  |
| Kenetlenme Enerji Değeri (Kcal/mol) | -8.26                                                        | -4.57                        | -8.64                                                                        |
| H Bağı Etkileşimleri (Å)            | TYR240(2.41)<br>ASN180(2.04)<br>LEU181(2.08)<br>GLU219(1.62) | HIS201(2.33)                 | TYR248(1.68)<br>HIS236(1.74)<br>HIS236(2.72)<br>ASP235(1.79)<br>ALA191(1.75) |
| Tuz Köprüsü Etkileşimleri (Å)       | Zn265(2.06)                                                  | -                            | Zn301(4.19)                                                                  |
| Metal koordinasyon etkileşimi (Å)   | Zn265(2.06)<br>Zn265(2.27)                                   | Zn256(2.26)                  | Zn301(1.98)                                                                  |
| Aromatik H Bağı Etkileşimleri (Å)   | -                                                            | HIS211(2.58)<br>PHE154(2.54) | -                                                                            |

TRE ile MMP-1' in aktif bağlanma bölgesinde yer alan benzer kalıntılar ASN180 ve LEU181 arasında H bağı etkileşimleri olduğu gösterilmiştir (Krusinska ve diğerleri, 2018).

Başka bir çalışmada Abalone peptidinin, MMP-1' in bağlanma bölgesinde ASN180, TYR237, THR241 ve TYR240 gibi amino asit kalıntıları ile hidrojen bağı etkileşimleri gerçekleştirdiği raporlanmıştır (Chen, Liang et al. 2019).

S1' ve S3' cepleri, MMP-1 inhibisyonu için oldukça önemlidir (Yuan, Lu et al. 2013). MMP-1' in inhibisyonu, GA'yı, Tyr240 dahil olmak üzere MMP-1'in S1 'cebine, Asn180 kalıntıları dahil olmak üzere MMP-1' in S3' cebine yerleştirilerek elde edilebilir.

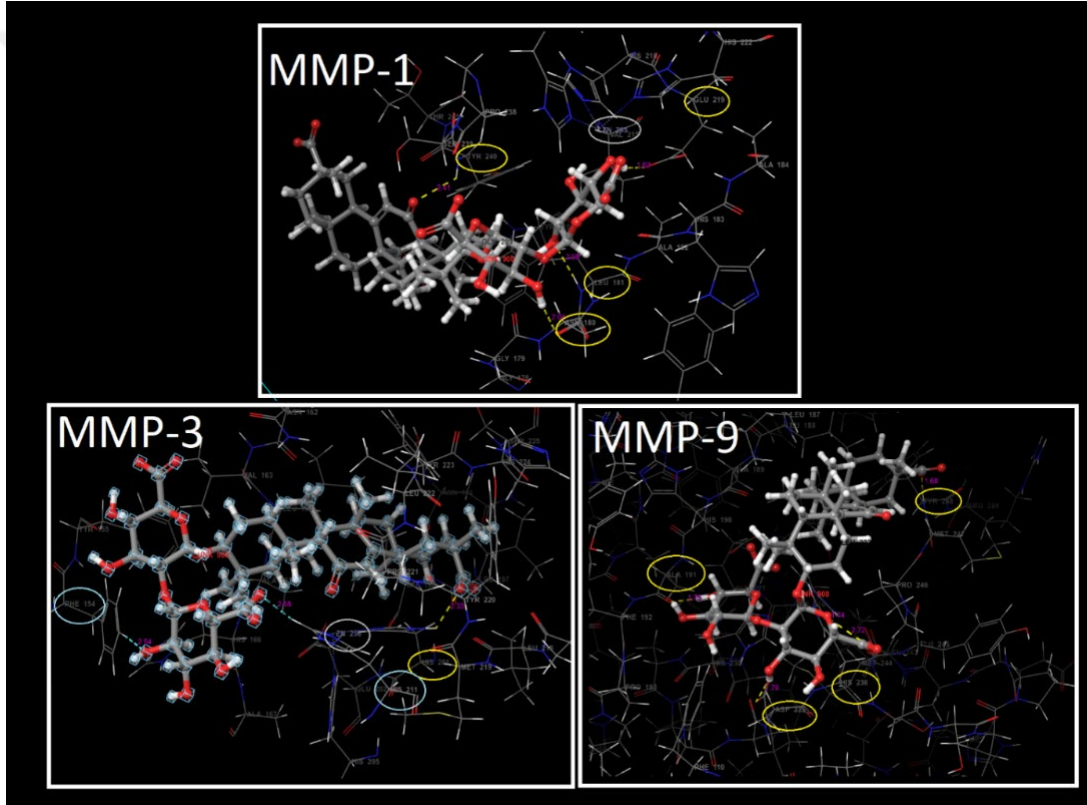
Şekil 4.8 MMP' ların aktif bağlanma bölgelerinde GA'in kenetlenmiş pozunu, mor ok H bağlanmayı, gri çizgiler metal koordinasyonlarını ve kırmızı çizgiler tuz köprüsü etkileşimlerini temsil etmektedir.



Şekil 4.8 GA'in moleküler kenetlenme sonuçları

MMP-3 için, GA yalnızca HIS201 kalıntısı ile H bağı (2.33 Å) ile etkileşime girmiş ve ayrıca Zn256 ve O atomu arasında bir metal koordinasyon etkileşimi (2.26 Å) meydana gelmiştir. Bu etkileşimlere ek olarak, HIS211 ve PHE154 kalıntıları arasında, iki aromatik H bağı etkileşimi (2.58 Å, 2.54 Å) kurulmuştur.

Şekil 4.9' da GA'nin sırasıyla MMP-1, MMP-3 ve MMP-9 ile arasındaki etkileşimler gösterilmiştir. Sarı daireler H bağı etkileşimli kalıntıları, mavi daireler aromatik H bağı etkileşimli kalıntıları, gri daireler sırasıyla MMP-1, MMP-3 ve MMP-9' un metal koordinasyon etkileşimini temsil etmektedir.



Şekil 4.9 GA'nin etkileşimleri

GA ve MMP-9, TYR248 (1.68 Å), HIS236 (1.74 Å), HIS236 (2.72 Å), ASP235 (1.79 Å) ve ALA191 (1.75 Å) arasındaki beş H bağı etkileşimi, en düşük bağlanma enerjisinin (-8,64 kcal/mol) olmasına neden olmuştur. Bu etkileşimlere ek olarak, Zn301 atomu ile tuz köprüsü etkileşimi (4.19 Å) ve metal koordinasyon etkileşimi (1.98 Å) de bu kararlı bağlanmaya katkıda bulunmuştur.

Ayrıca, bu çalışma GA'in Ala191 kalıntısı üzerinde etkileşime sahip olarak yeşil çay ekstresi inhibisyonuna benzer şekilde MMP-9' u inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu ileri sürmektedir (Sarkar, Nandy et al. 2016).

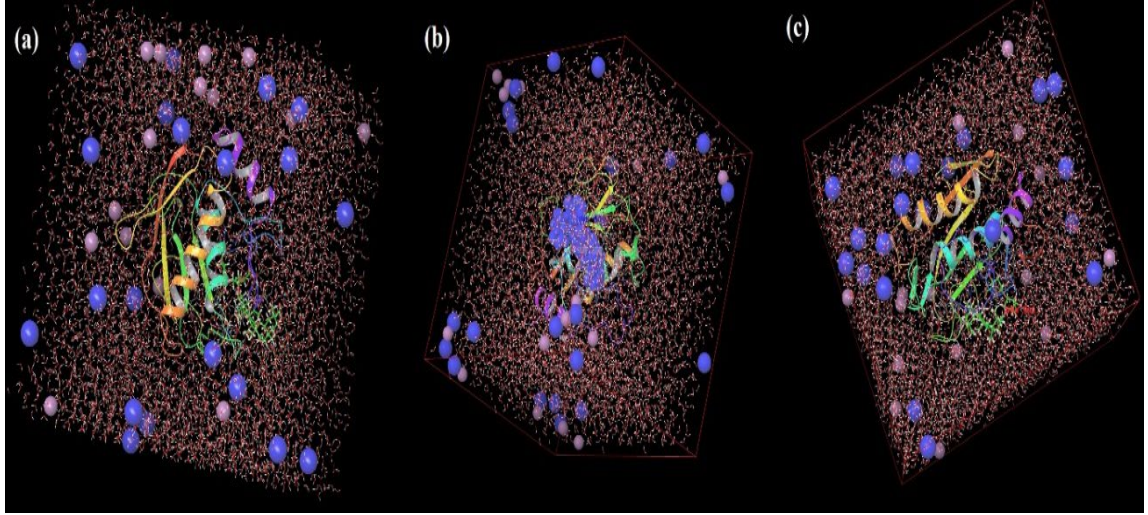
Kenetlenme çalışması, GA' in MMP' lar ile bağlanma etkileşimlerinin anlaşılmasının yanı sıra, MMP 'ların inhibisyonuna dayalı olarak cildin fotoyaşlanması üzerindeki aktivite profilinin tanımlanmasına izin vermektedir.

#### 4.5.2 Moleküler Dinamik Analizleri

50 ns MD simülasyonları, sırasıyla MMP-1 için -8,26 kcal/mol (PDB ID: 966C), MMP-3 için -4,57 kcal/mol (PDB ID: 2JT6) ve MMP-9 (PDB ID: 5CUH) proteini için -8.64 kcal/mol olan kenetlenme enerji değerlerine dayalı olarak GA üzerinde gerçekleştirilmiştir. RMSD, RMSF ve protein-ligand etkileşimleri, 50 ns MD analizi sonucunda oluşturulan MD yörüngeleri kullanılarak hesaplanmıştır. RMSD, ilk durum (referans) çerçevesine kıyasla protein-ligand kompleksindeki atomların yer değiştirmelerindeki ortalama sapmayı ifade etmektedir ve daha az RMSD varyasyonu, protein-ligand kompleksinin daha kararlı olduğu anlamına gelmektedir.

Şekil 4.10.a' da sunulan, 5.821 su molekülü sisteminde 20 Na<sup>+</sup> ve 16 Cl<sup>-</sup> iyonu ile nötralize edilen GA-MMP-1 kompleksinin sabit pozu ilk kez oluşturulmuştur. MMP-1' in Cα atomlarına bağlı olarak protein RMSD değeri 1.2 Å civarında, yan zincir için hesaplanan RMSD değeri ise 50 ns MD analizi sonucunda maksimum 2.4 Å olarak bulunmuştur.

Şekil 4.10.b' de de sunulan GA-MMP-3 sistemi içinde 50 ns MD analizi, toplam yükün 23 Na<sup>+</sup> ve 17 Cl<sup>-</sup> iyonu ve 6,006 su molekülü eklenerek nötralize edilmesiyle, gerçekleştirilmiştir. GA-MMP3 kompleksinin kenetlenmiş konformasyonunun MD analizi, protein Cα atomlarının RMSD'sinin 1.5 ila 2.5 Å arasında değiştiğini, GA'in RMSD'sinin ise 0 ns ile 20 ns arasında 1.5 ve 2 Å arasında dalgalandığı, 50 ns'ye kadar 1.5 Å' da kararlı olduğu görülmüştür.



**Şekil 4.10 a)** MMP-1(PDB ID: 966C), **b)** MMP-3(PDB ID: 2JT6), **c)** MMP-9(PDB ID: 5CUH) ile GA komplekslerinin MD sistem yapıları

Gözlenen 'Lig fit Prot' değeri, proteinin RMSD'sinden önemli ölçüde daha büyük olarak hesaplanırsa, ligandın ilk bağlanma bölgesinden uzağa dağılacağı; hesaplanan RMSD değerleri, proteinin RMSD değerini aşmıyorsa, ligandın ilk bağlanma bölgesi çevresinde yer alacağı anlamına gelmektedir.

Gözlenen 'Lig fit Prot' değeri proteinin RMSD'sini aşmadığı için GA'in ilk bağlanma bölgesi civarında kaldığını, Şekil 4.11.a 'da görülen bağlanma bölgesinin dışında başka bir bağlanma gerçekleşmediği düşünülmektedir. GA-966C kompleksinin Protein C $\alpha$ -atomları RMSD'si yeşil renkle, GA'in proteine göre RMSD'si mor renkle gösterilmiştir.

'Lig fit Lig', GA atomlarının iç dalgalanmalarını, yani bir ligandın RMSD'sini, GA-MMP-1 kompleksi için GA'daki dalgalanmaların 50 ns sırasında 0.4 Å'de görüldüğü referans konformasyonda hizalanmış ve ölçülmüştür.

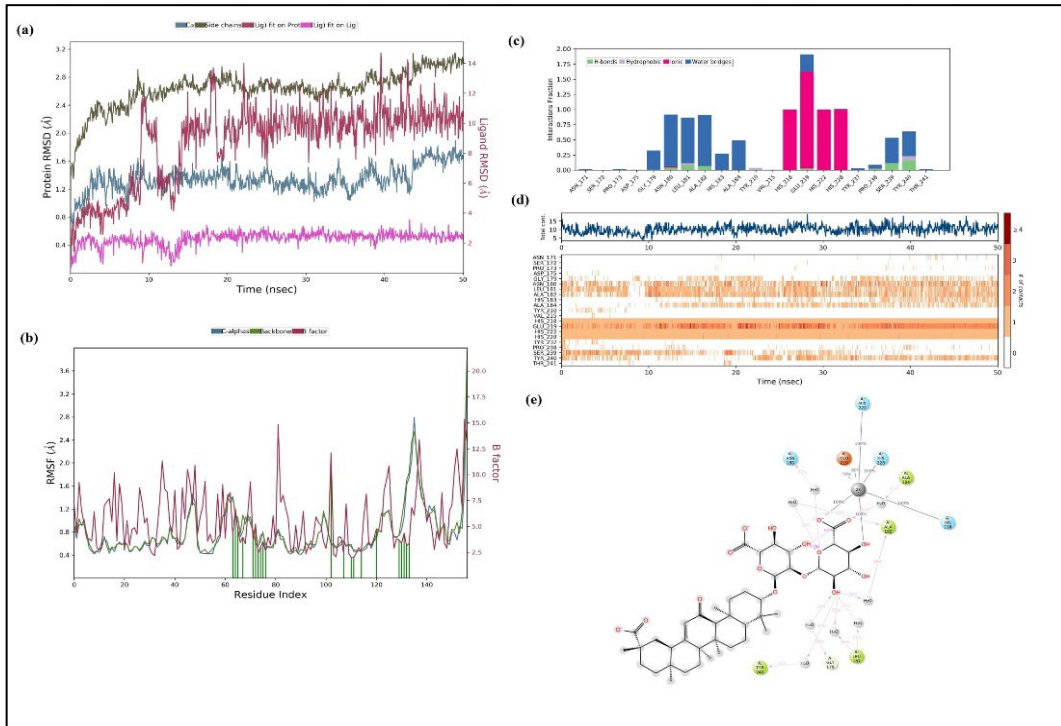
Hesaplanan RMSF parametresi, simülasyon sırasında protein zincirindeki lokal konformasyonel değişiklikleri vermektedir ve grafikteki protein ligand temasları da gözlemlenebilmektedir.

Şekil 4.11.b' de sunulduğu üzere, N- ve C-terminal kuyruklarının proteinin diğer herhangi bir parçasından daha fazla dalgalandığı gözlemlenmiştir.

Beta ipliklerinin ve alfa sarmallarının yapısındaki değişikliklerden kaynaklanan 80 ve 140 kalıntı indekslerinde gözle görülür dalgalanmalar gözlemlenmiştir. 50 ns simülasyonunun protein-ligand temas diyagramına göre, TYR240, SER239, GLU219, ALA182, LEU181 ve ASN180 kalıntıları GA ile H bağı etkileşimleri yapmıştır. HIS228, HIS222, GLU219 ve HIS218 kalıntıları iyonik etkileşimler göstermiştir.

Şekil 4.11.c' de sunulduğu üzere, HIS218, HIS222 ve HIS228 kalıntıları simülasyon süresinin % 100'ünde iyonik etkileşimler göstermiştir. Şekil 4.11.d' de etkileşimlerin ve temasların zaman çizelgesi temsili sunulmuştur. GA'in karbonil grubu, simülasyon yörüngesinin % 80'inde GLU219 ile belirgin bir H bağı etkileşimi yapmıştır.

HIS218, HIS222 ve HIS228, simülasyon süresinin % 100'ü ile iyonik etkileşimlerle etkileşime giren polar kalıntılardır. Şekil 4.11.e' de sunulduğu üzere, halka üzerindeki OH grubu ve O atomu sırasıyla % 27, % 35, % 39 ve % 20 olarak ASN180, LEU181, ALA182 ve TYR240 kalıntıları ile su aracılı bir H bağı oluşturmuşlardır.



**Şekil 4.11** MMP-1 (PDB ID: 966C) ile kompleks halinde GA'in MD simülasyon analizi



Ayrıca Lig fit Prot değeri protein RMSD değerini aşmayıp Şekil 4.12.a' da görülen ligand bağlama bölgesinin dışına çıkmamıştır. GA-2JT6 kompleksinin Protein Cα-atomları RMSD'si yeşil renkle, GA'in proteine göre RMSD'si mor renkle gösterilmiştir.

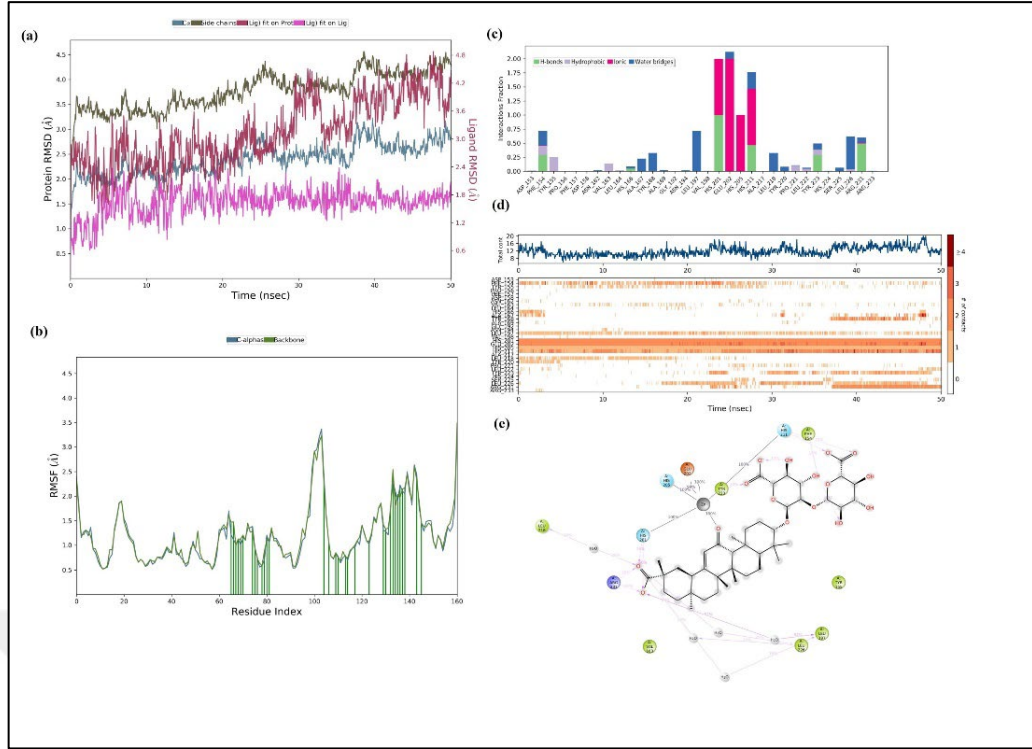
Şekil 4.12.b' de görülebileceği gibi, MMP-3 protein zinciri boyunca lokal değişiklikleri karakterize etmek için RMSF kullanılmıştır. En fazla dalgalanma N ve C terminalinde, 90. ve 100. kalıntı indeksi arasında büyük bir dalgalanma gözlenmiştir. Alfa sarmalları ve beta plakaları gibi protein ikincil yapı elemanları simülasyon boyunca izlendiğinde, bu dalgalanmaların beta plakalarından kaynaklandığı görülmektedir.

Simülasyon sırasında, Şekil 4.12.c' deki PHE154, HIS201, HIS211, TYR223 ve ARG231 kalıntıları arasında MMP-3 ve GA arasında H bağları oluşturulmuştur.

Etkileşimin simülasyon boyunca devam ettiği en uzun süreli H bağı etkileşimi HIS 201 ile sağlanmıştır. MMP3' ün bağlanma bölgesindeki kalıntılar ve simülasyon sırasındaki etkileşim süreleri Şekil 4.12.d' de gösterilmiştir.

Şekil 4.12.e' de gösterilen GA'in 2D etkileşim histogramı incelendiğinde, polar HIS 211, HIS205 ve HIS201'in O atomu ile iyonik etkileşimlerle birlikte H bağıyla % 100 etkileşime girdiği görülmektedir. PHE154 ise ligandla H bağı, hidrofobik ve su köprüsü gibi belirli bir temas üzerinden yapılmıştır.





**Şekil 4.12** MMP-3 (PDB ID: 2JT6) ile kompleks halinde GA'nın MD simülasyon analizi

Şekil 4.10.c 'de sunulan, 22 Na<sup>+</sup> ve 16 Cl<sup>-</sup> eklenerek nötrale edilen GA-MMP-9 sistemi 5.848 su molekülü ile MD hesaplaması için oluşturulmuştur.

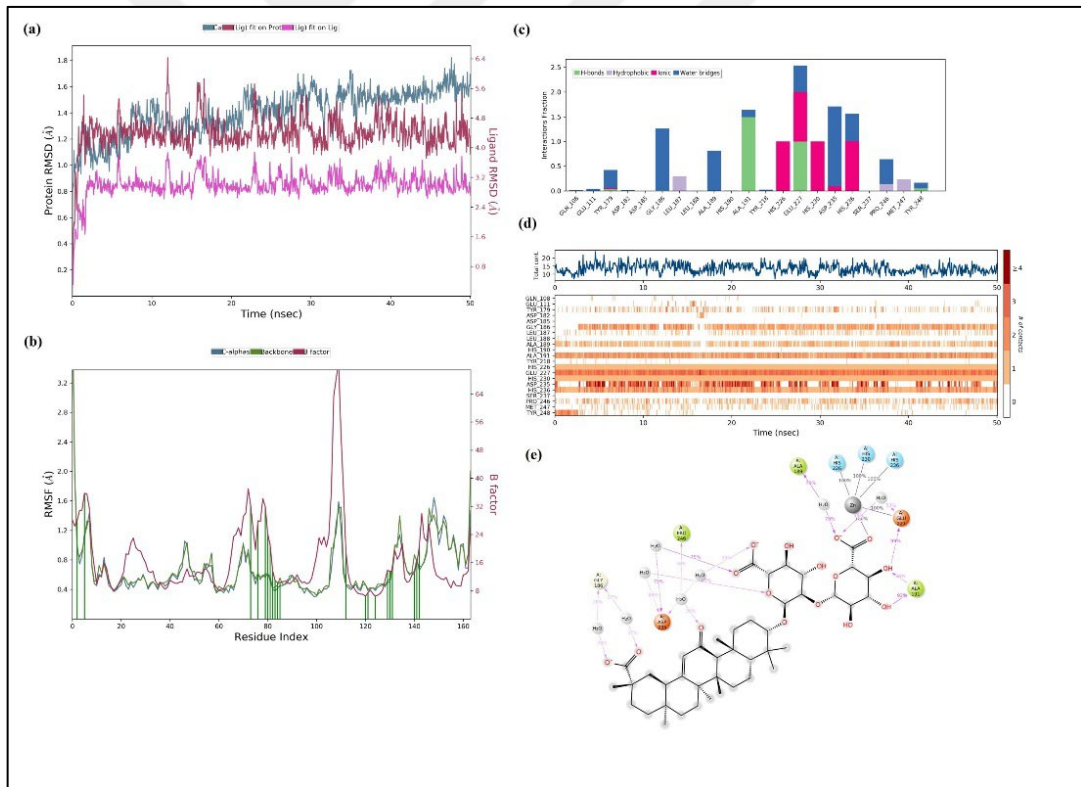
Cα olarak hesaplanan protein RMSD değeri 1 ile 1,6 Å arasında değişmektedir. Ligand için 50 ns'de hesaplanan RMSD değeri 1 Å ' ün altında olup Lig fit prot değeri Cαa için hesaplanan RMSD değerini aşmadığından GA'in MMP-9' un ligand bağlama bölgesi içinde kaldığı ve kararlı bir yapı oluşturduğu düşünülmektedir. Ligand ve protein RMSD'lerindeki dalgalanmalar, Şekil 4.13.a' da sunulduğu üzere, 10 ile 40 ns arasında gözlenmiştir.

MMP-9' un hesaplanan RMSF değerine göre, RMSF değerleri Şekil 4.13.b' de 60 ve 80 ve 100 ve 120 kalıntı indeksleri arasında artmıştır. 60 ile 80 arasındaki değişiklikler beta plakalarındaki değişikliklerden kaynaklanırken, 100 ile 120 arasındaki artış hem beta plakalarının hem de alfa sarmallarının yapısından kaynaklanmaktadır. Protein-ligand temasları ortaya çıktığında ALA191 ve GLU227 kalıntıları ile oluşan hidrojen bağlarının etkili olduğu görülmüştür.

ALA191 ve GLU227'nin GA bağlanması üzerindeki etkisi hemen hemen tüm simülasyon boyunca görülmüştür. Şekil 4.13.c ve 4.13.d' de sunulduğu üzere, HIS226, HIS230 ve HIS236 kalıntıları ile GA arasında 50 ns için iyonik etkileşimler meydana gelmiştir.

TYR248'in H bağlama etkisi simülasyonun ilk 20 ns'inde gözlemlenmiş, daha sonra su köprüsü etkileşimi nedeniyle bu etkileşim gözlemlenememiştir.

GLU227, belirtilen zaman çerçevesinde GA'nın OH grubu ile %99 H bağı teması göstermiştir; ALA191, GA'nın OH grubu ile sırasıyla %92 ve %56 ile iki H bağı teması gerçekleştirmiştir. Polar HIS226, HIS230 ve HIS236'nın O atomu ile iyonik etkileşimi %100 gerçekleşmiş; ALA189 Şekil 4.13.e'deki GA'nın 2B entegrasyon grafiğinde %79 ile GA'nın O atomu ile su aracılı H bağı teması olduğunu göstermiştir.



**Şekil 4.13** MMP-9 (PDB ID: 5CUH) ile kompleks halinde GA'nın MD simülasyon analizi

#### 4.5.3 Emilim, Dağılım, Metabolizma, Boşaltım ve Toksisite (ADMET) Çalışması

GA için ADMET değerlerine sahip farmakokinetik özellikler Tablo 4.12–4.14'de değerlendirilmiştir. Lipinski'nin beş kuralı için önerilen değerden daha büyük olan 822.94 g/mol moleküler ağırlığa sahip C<sub>42</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub> molekül formülüne sahip GA'in, alıcı sayısının yine 10'dan ve verici sayısının beşten büyük olduğu görülmüştür. GA üç Lipinski kuralı ihlaline ve düşük biyoyararlanım puanı değerine sahiptir.

**Tablo 4.12** Molinspiration ve SwissADME sunucuları tarafından ilaca benzerliğini gösteren GA sanal taraması

| Molinspiration                                    |                                                 |                                   |                                                                    |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Molinspiration özellik motoru                     |                                                 | Molinspirasyon biyoaktivite skoru |                                                                    |
| miLogP                                            | 1.97                                            | GPCR ligand                       | -1.78                                                              |
| TPSA Å <sup>2</sup> (Topolojik Polar Yüzey Alanı) | 267.04                                          | İyon kanalı modülatörü            | -3.09                                                              |
| Ağır atom sayısı                                  | 58                                              | Kinase inhibitörü                 | -3.09                                                              |
| Molekül Ağırlığı                                  | 822.94                                          | Nükleer reseptör ligandı          | -2.36                                                              |
| nON                                               | 16                                              | Proteaz inhibitörü                | -1.26                                                              |
| nOHNH                                             | 8                                               | Enzim inhibitörü                  | -1.93                                                              |
| nviolations                                       | 3                                               |                                   |                                                                    |
| nrotb                                             | 7                                               |                                   |                                                                    |
| Volume                                            | 741.93                                          |                                   |                                                                    |
| SwissADME                                         |                                                 |                                   |                                                                    |
| Fizikokimyasal Özellikler                         |                                                 | Lipofilisite                      |                                                                    |
| Formül                                            | C <sub>42</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub> | LogP <sub>O/W</sub> (iLOGP)       | 2.15                                                               |
| Molekül Ağırlığı                                  | 822.93 g/mol                                    | LogP <sub>O/W</sub> (XLOGP3)      | 2.80                                                               |
| TPSA Å <sup>2</sup>                               | 267.04 Å <sup>2</sup>                           | LogP <sub>O/W</sub> (WLOGP)       | 2.25                                                               |
| H-bağı Alıcılarının Sayısı                        | 16                                              | LogP <sub>O/W</sub> (MLOGP)       | 0.02                                                               |
| H-bağı Donörü Sayısı                              | 8                                               | LogP <sub>O/W</sub> (SILICOS-IT)  | 0.52                                                               |
| Molar Kırılma                                     | 202.84                                          | Consensus LogP <sub>O/W</sub>     | 1.55                                                               |
| Dönebilen bağ sayısı                              | 7                                               |                                   |                                                                    |
| Ağır atom sayısı                                  | 58                                              | Suda Çözünürlük                   |                                                                    |
| Aromatik ağır atom sayısı                         | 0                                               | Log S (ESOL)                      | -6.24                                                              |
|                                                   |                                                 | Log S (Ali)                       | -8.06                                                              |
|                                                   |                                                 | Log S (SILICOS-IT)                | -1.39                                                              |
| Farmakokinetik                                    |                                                 | İlaç Benzerliği                   |                                                                    |
| Gastrointestinal Absorpsiyon                      | Düşük                                           | Lipinski                          | No; 3 violations: M <sub>w</sub> >500, N or O >10, NH or OH >5     |
| Kan Beyin Bariyeri Geçirgenliği                   | Hayır                                           | Ghose                             | No; 3 violations: M <sub>w</sub> >480, M <sub>R</sub> >130         |
| P-gp Substratı                                    | Evet                                            | Veber                             | No; 1 violation: TPSA>140                                          |
| Log Kp (Deri geçirgenliği cm/s)                   | -9.33 cm/s                                      | Muegge                            | No; 4 violations: M <sub>w</sub> >600, TPSA>150, H-acc>10, H-don>5 |
|                                                   |                                                 | Biyoyararlanım Puanı              | 0.11                                                               |

**Tablo 4.13** pkCSM sunucusu tarafından ADME ve toksisiteyi gösteren GA'in farmakokinetik özellikleri

|                     | Tanımlayıcı                           |                  | Birim                                    |
|---------------------|---------------------------------------|------------------|------------------------------------------|
| EMİLİM              | Suda Çözünürlük                       | -2.892           | Nümerik (log mol/L)                      |
|                     | Caco2 Permeabilitesi                  | -0.812           | Nümerik (log Papp 10 <sup>-6</sup> cm/s) |
|                     | Bağırsak Emilimi (insan)              | 0                | Nümerik (%)                              |
|                     | Deri geçirgenliği                     | -2.735           | Nümerik (log Kp)                         |
|                     | P-glycoprotein Substratı              | Evet             | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | P-glycoprotein I İnhibitörü           | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | P-glycoprotein II İnhibitörü          | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
| DAĞILIM             | VDss (insan)                          | -0.615           | Nümerik (log L/kg)                       |
|                     | Bağlanmamış kesir (insan)             | 0.421            | Nümerik (Fu)                             |
|                     | BBB Permeabilitesi                    | -1.494           | Nümerik (log BB)                         |
|                     | CNS Permeabilitesi                    | -4.206           | Nümerik (log PS)                         |
| METABOLİZMA         | CYP2D6 Substratı                      | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | CYP3A4 Substratı                      | Evet             | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | CYP1A2 İnhibitörü                     | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | CYP2C19 İnhibitörü                    | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | CYP2C9 İnhibitörü                     | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | CYP2D6 İnhibitörü                     | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | CYP3A4 İnhibitörü                     | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
| BOŞALTIM            | Total Clearance                       | -0.304           | Nümerik (log ml/min/kg)                  |
|                     | Renal OCT2 Substratı                  | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
| TOKSİSİTE           | AMES toksitesi                        | Hayır            | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | Maksimum tolere edilen doz (insan)    | 0.389            | Nümerik (log mg/kg/gün)                  |
|                     | hERG I İnhibitörü                     | No               | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | hERG II İnhibitörü                    | No               | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | Oral Sıçan Akut Toksisitesi (LD50)    | 2.48             | Nümerik (mol/kg)                         |
|                     | Oral Sıçan Kronik Toksisitesi (LOAEL) | 5.889            | Nümerik (log mg/kg_bw/gün)               |
|                     | Hepatotoksisite                       | No               | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | Cilt Hassasiyeti                      | No               | Kategorik (Evet/Hayır)                   |
|                     | <i>T.Pyiformis</i> Toksisitesi        | 0.285            | Nümerik (log ug/L)                       |
|                     | Minnow Toksisitesi                    | 5.591            | Nümerik (log mM)                         |
| Molekül Özellikleri |                                       |                  |                                          |
| Tanımlayıcı         | Değer                                 |                  | Değer                                    |
| Molekül Ağırlığı    | 822.942                               | Dönebilen bağlar | 7                                        |
| LogP                | 2.2456                                | Alıcılar         | 13                                       |
| Yüzey Alanı         | 337.426                               | Donörler         | 8                                        |

ProTox-II web sunucusu, oral toksisite, hepatotoksisite, karsinojenite, immünotoksisite, mutajenisite, sitotoksisite gibi toksik yanıtların arkasındaki olası moleküler mekanizma hakkında bilgi sağlamaktadır.

GA'in hepatotoksisitesi, karsinojenitesi, immünotoksisitesi, mutajenitesi ve sitotoksisitesi ve ProTox-II web sunucusu kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.14). ProTox-II mutajenite tahmini, Ames testi ve CEBS veri tabanından alınan verilere göre hesaplanmıştır. GA için bu değerin, bu web sunucusu kullanılarak etkin olmadığı bulunmuştur. *In vitro* AMES test sonuçlarına göre, GA'in düşük konsantrasyonlarda genotoksik etkisinin olmadığı, GA yüklü PLGA nanoformülasyonun tüm konsantrasyonlarının ise genotoksik etkisinin olmadığı bulunmuştur.

**Tablo 4.14** ProTox-II- GA için oral toksisite tahmin sonuçları

| Sınıflandırma                                     | Hedef                                                                          | Tahmin | Olasılık |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------|----------|
| <b>Toksisite</b>                                  | Hepatotoksisite                                                                | Pasif  | 0.88     |
|                                                   | Karsinojenite                                                                  | Pasif  | 0.61     |
|                                                   | İmmünotoksisite                                                                | Aktif  | 0.99     |
|                                                   | Mutajenisite                                                                   | Pasif  | 0.96     |
|                                                   | Sitotoksisite                                                                  | Pasif  | 0.73     |
| <b>Tox21-Nuclear receptor signalling pathways</b> | Aril hidrokarbon Reseptörü                                                     | Pasif  | 0.99     |
|                                                   | Androgen Reseptörü                                                             | Pasif  | 0.89     |
|                                                   | Androjen Reseptör Ligand Bağlama Alanı                                         | Pasif  | 0.96     |
|                                                   | Aromataz                                                                       | Pasif  | 0.87     |
|                                                   | Östrojen Reseptörü Alfa                                                        | Pasif  | 0.74     |
|                                                   | Östrojen Reseptör Ligand Bağlama Alanı                                         | Pasif  | 0.98     |
|                                                   | Peroksizom Proliferatör Aktive Reseptör Gama                                   | Pasif  | 0.99     |
| <b>Tox21-Stress response pathways</b>             | Nükleer faktör (eritroitten türetilen 2) benzeri 2/antioksidan duyarlı element | Pasif  | 0.95     |
|                                                   | Isı şok faktörü tepki elemanı                                                  | Pasif  | 0.95     |
|                                                   | Mitokondriyal Membran Potansiyeli                                              | Pasif  | 0.83     |
|                                                   | Fosfoprotein (Tümör Baskılayıcı) p53                                           | Pasif  | 0.98     |
|                                                   | ATPase ailesi AAA alanı içeren protein 5                                       | Pasif  | 0.97     |

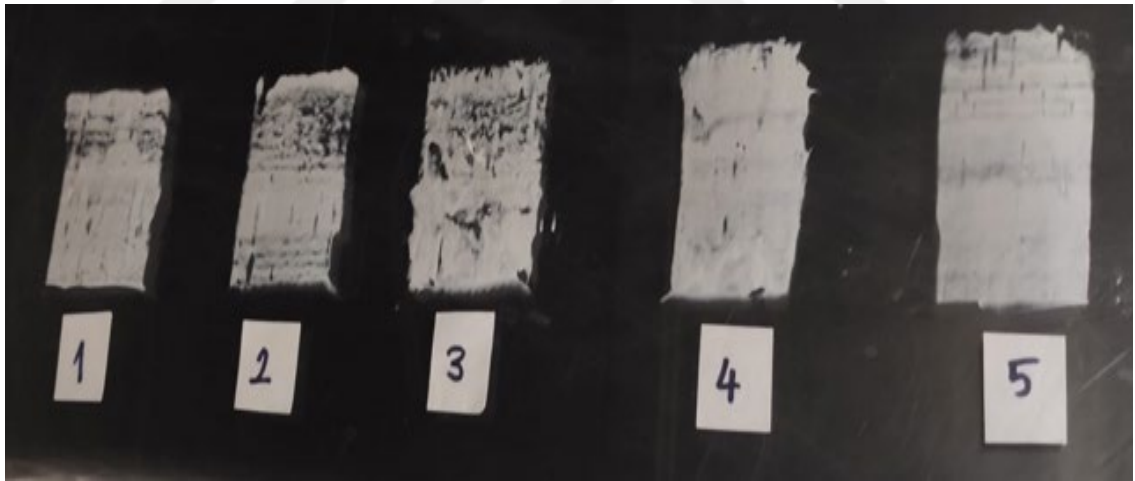
## 4.6 Nihai Formülasyon Çalışmaları

### 4.6.1 Plasebo Kremlerin Fiziksel Analiz Sonuçları

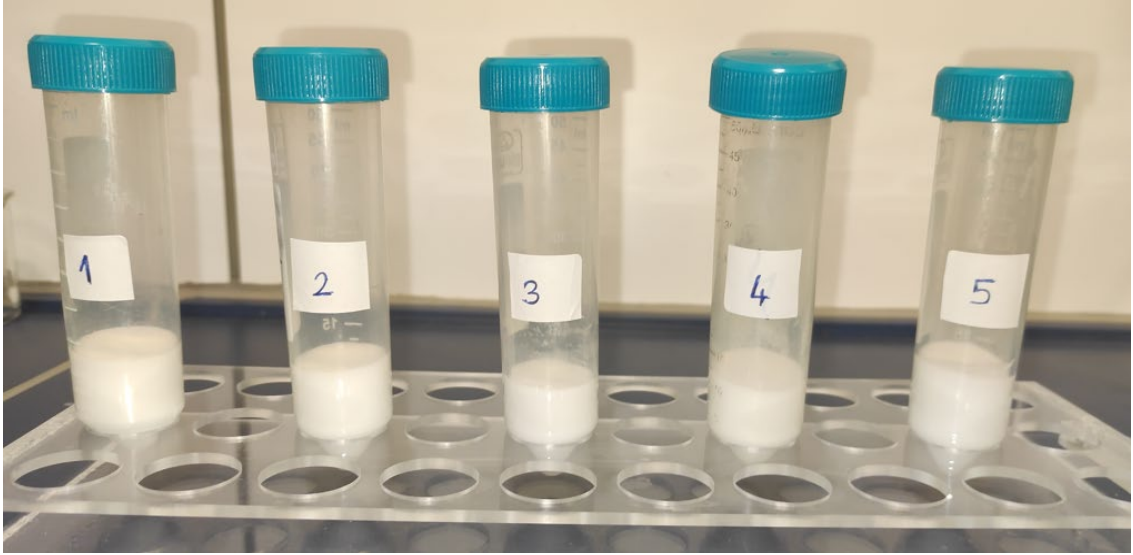
Hazırlanan plasebo kremlerin organoleptik, pH ve faz ayrımı analiz sonuçları Tablo 4.15’ de, görüntüleri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15’ de verilmiştir.

**Tablo 4.15** Plasebo kremlerin fizikokimyasal karakterizasyon analiz sonuçları

| Formülasyon No | Görünüş             | Sürülebilirlik | pH   | Faz Ayrımı |
|----------------|---------------------|----------------|------|------------|
| F-1            | Beyaz, homojen krem | Orta           | 4.10 | Yok        |
| F-2            | Beyaz, homojen krem | Orta           | 4.28 | Yok        |
| F-3            | Beyaz, homojen krem | Orta           | 4.05 | Yok        |
| F-4            | Beyaz, homojen krem | İyi            | 4.40 | Yok        |
| F-5            | Beyaz, homojen krem | Çok iyi        | 4.90 | Yok        |



**Şekil 4.14** Plasebo kremlerin sürülebilirlik testi



**Şekil 4.15** Plasebo kremlerin faz ayrımı kontrolü

Organoleptik ve pH analiz sonuçları incelendiğinde en uygun formülasyonun F-5 olduğuna ve geliştirilmesi planlanan nihai formülasyonlarda bu formülasyonun referans alınmasına karar verilmiştir.

#### 4.6.2 GA Yüklü PLGA Nanoformülasyonu İçeren Formülasyonların Fiziksel Analiz Sonuçları

GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonlarının plasebo krem formülasyonu ile karşılaştırmalı olarak organoleptik, pH ve faz ayrımı analiz sonuçları Tablo 4.16’ da verilmiştir. Şekil 4.16’ da sunulduğu üzere kremlerde santrifüj işlemi sonrası faz ayrımı olmadığı gözlemlenmiştir.

**Tablo 4.16** Nihai formülasyonların fiziksel analiz sonuçları

| Formülasyon    | Görünüş             | pH   |      |      | Faz Ayrımı |
|----------------|---------------------|------|------|------|------------|
|                |                     | Alt  | Orta | Üst  |            |
| <b>Plasebo</b> | Beyaz, homojen krem | 4.89 | 4.86 | 4.93 | Yok        |
| <b>A</b>       | Beyaz, homojen krem | 5.20 | 5.21 | 5.25 | Yok        |
| <b>B</b>       | Beyaz, homojen krem | 5.21 | 5.22 | 5.17 | Yok        |

A: 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

B: 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu



**Şekil 4.16** Nihai formülasyonların faz ayrımı kontrolü

Nanoformülasyon içeren kremlerin viskozite ölçümleri için metot geliştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda, yapılan çalışmalara ait koşullar ve sonuçlar Tablo 4.17’ de verilmiştir.

**Tablo 4.17** Viskozite ölçüm sonuçları

| Spindle | S64    |              |        |              |        |              | T95    |              |
|---------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
| rpm     | 3      |              | 6      |              | 10     |              | 0.3    |              |
|         | Tork % | Viskozite cP | Tork % | Viskozite cP | Tork % | Viskozite cP | Tork % | Viskozite cP |
| Plasebo | 37.5   | 75.000       | 54.0   | 54.200       | 73.1   | 44.340       | 35.5   | 553.100      |
| A       | 54.7   | 108.000      | 63.6   | 63.100       | 73.0   | 44.220       | 55.0   | 862.100      |
| B       | 46.1   | 92.000       | 63.6   | 64.400       | 73.2   | 43.900       | 56.2   | 882.800      |

**A:** 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

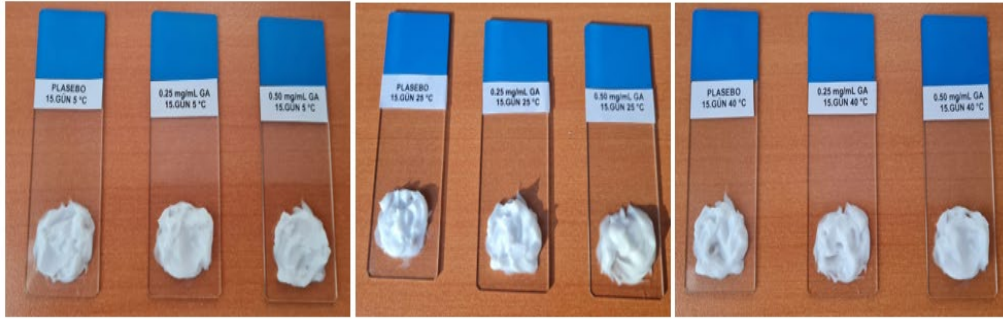
**B:** 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

Ölçüm sonuçları incelenerek S-64 Spindle 10 rpm uygun metot olarak belirlenmiştir.



#### 4.7 Stabilit e alışmaları

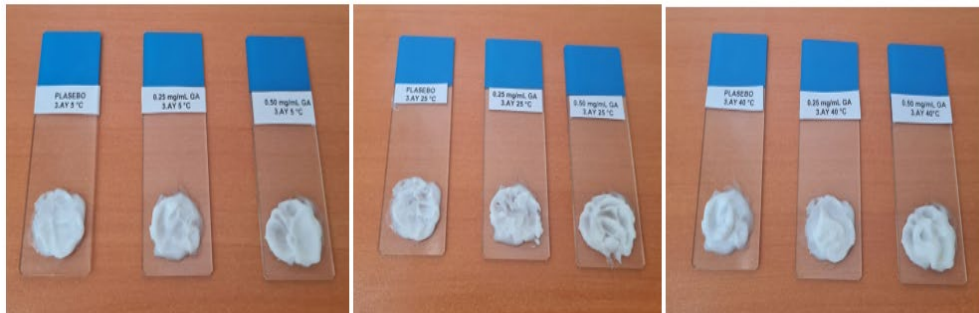
5 ± 3  C, 25 ± 2  C % 60 RH ve 40 ± 2  C % 75 RH koşullarında stabilit ye kaldırılan 15.gün, 1.ay, 3.ay krem numuneleri, başlangıç krem numuneleri ile karşılaştırıldığında görünüşlerinde değişiklik olmamış, şekil 4.17, 4.18, 4.19' da gösterildiği gibi beyaz, homojen krem şeklinde gözlemlenmiştir.



şekil 4.17 15.gün numunelerinin görünüşleri

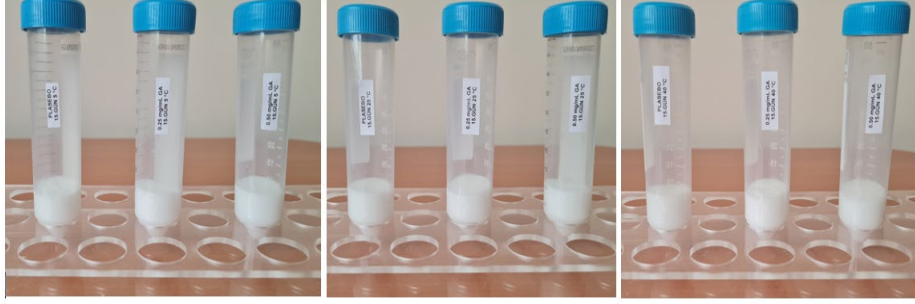


şekil 4. 18 1.ay numunelerinin görünüşleri



şekil 4.19 3.ay numunelerinin görünüşleri

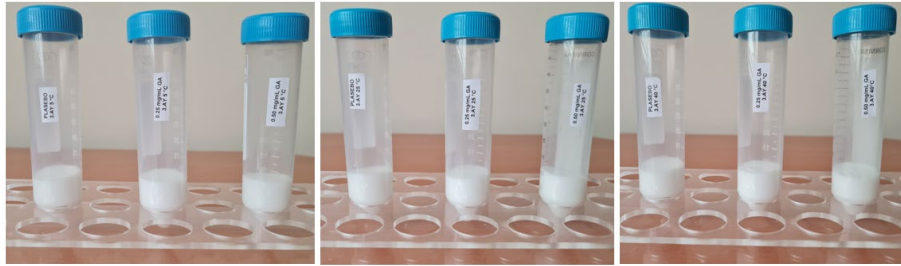
5  $\pm$  3  $^{\circ}$ C, 25  $\pm$  2  $^{\circ}$ C % 60 RH, 40  $\pm$  2  $^{\circ}$ C %75 RH koşullarında stabiliteye kaldırılan 15.gün, 1.ay, 3.ay krem numunelerine 4000 rpm'de 30 dk santrifüj işlemi uygulanmış, Şekil 4.20, 4.21, 4.22'de görüldüğü üzere numunelerde faz ayrımı gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.20 15.gün numunelerinin faz ayrımı kontrolü



Şekil 4.21 1.ay numunelerinin faz ayrımı kontrolü



Şekil 4.22 3.Ay numunelerinin faz ayrımı kontrolü

5  $\pm$  3  $^{\circ}$ C, 25  $\pm$  2  $^{\circ}$ C %60 RH, 40  $\pm$  2  $^{\circ}$ C % 75 RH koşullarında stabiliteye kaldırılan 15.gün, 1.ay, 3.ay krem numunelerinin viskozite ölçümleri yapılmıştır.

Ölçüm sonuçları başlangıç ölçüm sonuçları ile karşılaştırmalı olarak Tablo 4.18, 4.19, 4.20' de verilmiştir.

Sonuçlarda görüleceği üzere kremlerin başlangıç viskozite değerleri birbirine yakın olup stabilite sürecinde benzer şekilde devam etmiş, sonuçlarda kayda değer bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

**Tablo 4.18 15.gün viskozite ölçüm sonuçları**

| S64 Spindle | Başlangıç |                 | 15.gün-5 °C |                 | 15.gün-25 °C |                 | 15.gün-40 °C |                 |
|-------------|-----------|-----------------|-------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
|             | 10 rpm    |                 |             |                 |              |                 |              |                 |
|             | Tork<br>% | Viskozite<br>cP | Tork<br>%   | Viskozite<br>cP | Tork<br>%    | Viskozite<br>cP | Tork<br>%    | Viskozite<br>cP |
| Plasebo     | 72.0      | 43.740          | 75.0        | 45.000          | 77.1         | 46.500          | 75.2         | 44.500          |
| A           | 73.0      | 44.220          | 74.0        | 44.310          | 75.2         | 45.000          | 76.1         | 45.900          |
| B           | 73.2      | 43.900          | 75.1        | 45.500          | 74.1         | 45.470          | 78.5         | 47.000          |

A: 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

B: 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

**Tablo 4.19 1.ay viskozite ölçüm sonuçları**

| S64 Spindle | Başlangıç |                 | 1.ay-5 °C |                 | 1.ay-25 °C |                 | 1.ay-40 °C |                 |
|-------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|
|             | 10 rpm    |                 |           |                 |            |                 |            |                 |
|             | Tork<br>% | Viskozite<br>cP | Tork<br>% | Viskozite<br>cP | Tork<br>%  | Viskozite<br>cP | Tork<br>%  | Viskozite<br>cP |
| Plasebo     | 72.0      | 43.740          | 75.5      | 45.360          | 75.1       | 44.920          | 74.2       | 44.460          |
| A           | 73.0      | 44.220          | 76.3      | 45.790          | 74.6       | 44.820          | 76.4       | 46.200          |
| B           | 73.2      | 43.900          | 75.3      | 45.140          | 74.5       | 44.580          | 78.6       | 47.160          |

A: 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

B: 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

**Tablo 4.20** 3.ay viskozite ölçüm sonuçları

| S64 Spindle | Başlangıç |                 | 3.ay-5 °C |                 | 3.ay-25 °C |                 | 3.ay-40 °C |                 |
|-------------|-----------|-----------------|-----------|-----------------|------------|-----------------|------------|-----------------|
| 10 rpm      | Tork<br>% | Viskozite<br>cP | Tork<br>% | Viskozite<br>cP | Tork<br>%  | Viskozite<br>cP | Tork<br>%  | Viskozite<br>cP |
| Plasebo     | 72.0      | 43.740          | 76.2      | 46.080          | 76.3       | 45.858          | 76.8       | 46.020          |
| A           | 73.0      | 44.220          | 76.1      | 46.100          | 76.2       | 46.120          | 76.0       | 45.720          |
| B           | 73.2      | 43.900          | 76.7      | 46.180          | 76.5       | 45.783          | 76.7       | 46.000          |

**A:** 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

**B:** 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

5 ± 3 °C, 25 ± 2 °C % 60 RH, 40 ± 2 °C %75 RH koşullarında stabiliteye kaldırılan 15.gün, 1.ay, 3.ay numuneleri, cam tüplere alınarak tüplerin alt, orta, üst noktalarında pH ölçümleri yapılmıştır. Ölçüm sonuçları başlangıç ölçüm sonuçları ile karşılaştırmalı olarak Tablo 4.21, 4.22, 4.23' de verilmiştir.

**Tablo 4.21** 15.gün pH ölçüm sonuçları

| pH               | Ölçüm Yeri | Plasebo | A    | B    |
|------------------|------------|---------|------|------|
| Başlangıç        | Alt        | 4.89    | 5.20 | 5.21 |
|                  | Orta       | 4.86    | 5.21 | 5.22 |
|                  | Üst        | 4.93    | 5.25 | 5.17 |
| 5 ± 3 °C         | Alt        | 5.07    | 5.09 | 5.12 |
|                  | Orta       | 4.98    | 5.09 | 5.20 |
|                  | Üst        | 5.02    | 5.10 | 5.14 |
| 25 ± 2 °C %60 RH | Alt        | 4.87    | 5.01 | 5.03 |
|                  | Orta       | 4.84    | 5.00 | 5.02 |
|                  | Üst        | 4.92    | 4.99 | 5.07 |
| 40 ± 2 °C %75 RH | Alt        | 4.18    | 4.35 | 4.38 |
|                  | Orta       | 4.20    | 4.31 | 4.32 |
|                  | Üst        | 4.27    | 4.32 | 4.31 |

**A:** 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

**B:** 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

**Tablo 4.22 1.ay pH ölçüm sonuçları**

| pH               | Ölçüm Yeri | Plasebo | A    | B    |
|------------------|------------|---------|------|------|
| Başlangıç        | Alt        | 4.89    | 5.20 | 5.21 |
|                  | Orta       | 4.86    | 5.21 | 5.22 |
|                  | Üst        | 4.93    | 5.25 | 5.17 |
| 5 ± 3 °C         | Alt        | 4.84    | 5.03 | 5.18 |
|                  | Orta       | 4.71    | 4.98 | 5.16 |
|                  | Üst        | 4.68    | 4.97 | 5.19 |
| 25 ± 2 °C %60 RH | Alt        | 4.65    | 4.92 | 4.99 |
|                  | Orta       | 4.66    | 4.89 | 5.03 |
|                  | Üst        | 4.69    | 4.88 | 5.01 |
| 40 ± 2 °C %75 RH | Alt        | 3.76    | 3.83 | 3.76 |
|                  | Orta       | 3.75    | 3.81 | 3.75 |
|                  | Üst        | 3.73    | 3.89 | 3.74 |

A: 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

B: 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

**Tablo 4.23 3.ay pH ölçüm sonuçları**

| pH               | Ölçüm Yeri | Plasebo | A    | B    |
|------------------|------------|---------|------|------|
| Başlangıç        | Alt        | 4.89    | 5.20 | 5.21 |
|                  | Orta       | 4.86    | 5.21 | 5.22 |
|                  | Üst        | 4.93    | 5.25 | 5.17 |
| 5 ± 3 °C         | Alt        | 4.62    | 5.05 | 5.12 |
|                  | Orta       | 4.62    | 5.03 | 5.14 |
|                  | Üst        | 4.61    | 5.01 | 5.15 |
| 25 ± 2 °C %60 RH | Alt        | 4.31    | 4.61 | 4.85 |
|                  | Orta       | 4.35    | 4.58 | 4.89 |
|                  | Üst        | 4.34    | 4.59 | 4.88 |
| 40 ± 2 °C %75 RH | Alt        | 3.37    | 3.60 | 3.52 |
|                  | Orta       | 3.35    | 3.58 | 3.51 |
|                  | Üst        | 3.36    | 3.57 | 3.54 |

A: 0.25 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

B: 0.50 mg/mL GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonu

Ölçülen pH değerleri incelendiğinde, 3 ay sonunda krem formülasyonlarının pH değerlerinin benzer şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. 40 ± 2 °C % 75 RH zorlayıcı stabilite koşulundaki azalmanın diğer sıcaklık değerlerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu koşuldaki pH değerlerinin, insan deri pH değerleri aralığında (4.1–5.8) olmaması sebebiyle, 40 ± 2 °C % 75 RH koşulunun uygun saklama koşulu olmadığı tespit edilmiştir.

Epidermisin baskın hücreleri olan keratinositler, güneş yanığı ve fotoyaşlanmaya sebep olan UVB ışınları için önemli hücresel hedeflerdir. Aşırı UVB maruziyeti, keratinositlerde morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri içeren çeşitli sinyal yanıtlarına yol açarak plazma membranı ve DNA hasarlarına sebep olmaktadır.

UVB, aşırı ROS üretimini indükleyerek MMP'ların seviyesi üzerinde bir etkiye yol açmaktadır (Krusinska, Hawrysz et al., 2018). MMP'lar cilt foto yaşılanma sürecinde önemli bir rol oynamaktadır. Fotoyaşlanan ciltte MMP'ların yüksek ekspresyonu, MMP'ları UVB radyasyonunun neden olduğu cilt fotoyaşlanmasının ana hedefi haline getiren cilt elastikiyet kaybının ve kırışık oluşumunun başlıca nedenlerinden biridir (Gentile and Garcovich 2021; Kim, Jang et al., 2022)

Fotoyaşlanmanın önlenmesi için çeşitli topikal uygulamalar mevcuttur. Bu amaçla kullanılan kozmetik ürünler arasında antioksidanlar, vitaminler, hidroksi asitler ve bitki ekstraktları yer almaktadır. Bu ürünler, ciltteki kırışıklıkların azaltılması ve cildin yeniden yapılanmasına katkıda bulunmaktadır.

Nanoformülasyonlar, etkin maddelerin kontrollü salımını, yüksek yükleme verimliliği ve iyileştirilmiş cilt penetrasyonu gibi etkileri sayesinde son yıllarda artan tüketici taleplerine karşılık olarak, kozmetik ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılmakta ve anti aging ürünler için geliştirilen formülasyonların büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır.

Birleşmiş Milletler 2019 yılı raporuna göre, dünyada yaklaşık 703 milyon kişi 65 yaş ve üzerinde iken yaşlı nüfusun 2050'de ikiye katlanarak 1.5 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Yaşlı nüfustaki artışla birlikte dermatolojik bakıma gösterilen ilginin ve duyulan ihtiyacın artış göstermesi muhtemeldir. Artan yaşla birlikte, bağ dokusundaki değişiklikler, cildin gücünde ve elastikiyetinde azalma ve yağ bezlerindeki salgılarda azalma gibi faktörler nedeniyle ciltle ilgili rahatsızlıkların gelişme riski artmaktadır.

Türkiye’de, kozmetik ve kişisel bakım ürünleri pazarı her yıl ortalama % 10 oranında büyüme gösterirken, doğal kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinin ise, dünya pazarıyla paralel olarak, % 5’ lik bir pazar payına sahip olduğu tahmin edilmektedir. Türkiye pazarındaki ürünlerin ise sadece % 10’unu Türkiye menşeli ürünler oluşturmaktadır. Geliştirilecek yeni ürünler ile pazarda dışa bağımlılığın azaltılması ve pazardaki yerli ürün sayılarının arttırılması için arge çalışmalarına gereksinim duyulmaktadır.

Detaylı yapılan literatür araştırmalarında, GA’in anti aging özellik gösteren bir nanoformülasyonunun hazırlandığı bir çalışma bulunamamıştır.

Bu doktora tezi çalışmasında geliştirilen anti aging özellik gösteren GA nanoformülasyonunun kozmetik pazarı için alternatif bir günlük bakım ürünü olarak değerlendirilebileceği ön görülmektedir.

Bu doktora tezi kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar aşağıda sıralanmıştır.

1. GA için analitik metot geliştirmiş ardından analitik validasyon çalışmaları yapılmıştır.
2. GA yüklü PLGA nanoformülasyonu çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır.
3. Hazırlanan nanoformülasyona DLS ve SEM analizleri yapılmış, enkapsülasyon verimini ve yükleme kapasitesi hesaplanmış, salım profili incelenerek karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
4. GA yüklü PLGA nanoformülasyonun ve GA’in genotoksisitelerinin değerlendirmeleri amacıyla Ames deneyleri gerçekleştirilmiştir.
5. GA yüklü PLGA nanoformülasyonun ve GA’in sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla MTT deneyleri gerçekleştirilmiştir.
6. GA ve MMP’lar arasındaki doğrudan etkileşimi moleküler bazda ortaya çıkarmak için moleküler kenetlenme ve moleküler dinamik simülasyon çalışmaları yapılmış, GA için ADMET değerlerine sahip farmakokinetik özellikler değerlendirilmiştir.
7. Nanoformülasyon içeren kremler hazırlanmış; kremlere organoleptik, pH, faz ayrımı ve viskozite analizleri yapılmıştır.

8. Hazırlanan kremler  $5 \pm 3$  °C,  $25 \pm 2$  °C % 60 RH,  $40 \pm 2$  °C %75 RH koşullarında 3 ay süreyle stabilite kabinlerine kaldırılmış; 15.gün, 1.ay ve 3.ay zaman periyotlarında kremlere organoleptik, pH, faz ayrımı ve viskozite analizleri yapılmıştır.

Bu doktora tezi çalışması kapsamında, ilk olarak GA için analitik metot geliştirilmiş; analitik validasyon çalışmaları yapılarak geliştirilen bu yöntemin, seçicilik, doğrusallık, kesinlik, doğruluk ve sağlamlık kriterlerini karşıladığı ispatlanmıştır.

Validasyon çalışmalarını takiben, boş PLGA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyon çift emülsiyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Boş ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonlara eş zamanlı olarak DLS analizleri yapılarak, etkin madde yüklemesi ile nanoformülasyonların özelliklerinin literatürle uyumlu olarak değişimleri belirlenmiştir.

PdI değeri, kolloidal sistem içindeki partiküllerin boyut popülasyonlarının dağılımını ifade etmektedir. Bu değer 0.0 ile 1.0 arasında değişmekte, değer arttıkça partiküllerin boyut dağılımı farklılıklar göstermekte ve dolayısıyla heterojen bir boyut dağılımı gözlemlenmektedir (Anwer, Mohammad et al., 2019). Genellikle polimer bazlı nanoparçacık malzemeler için 0.2 ve altındaki değerler monodispers durumu göstermektedir (Clarke, 2013; Danaei, Dehghankhold et al., 2018).

Tablo 4.8 ve Şekil 4.2’de sunulduğu üzere, boş PLGA nanoformülasyonunda ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunda PdI sırasıyla  $0.031 \pm 0.017$  ve  $0.070 \pm 0.042$  olarak ölçülmüştür. Bu PdI değerleri, nanoformülasyonun monodispers halde olduğunu ve yüksek kaliteli bir dağılıma sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Literatürde etken madde ilavesinden sonra Z-Ave değerinin arttığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Partikül boyutundaki bu artışın, kapsülleme işlemi sırasında aktif maddenin fonksiyonel gruplarının polimer zincirleri ile etkileşiminden dolayı meydana geldiği düşünülmektedir.



Şenel ve arkadaşları, flurbiprofen nanopartikülleri hazırlamış, boş nanopartiküllerin Z-Ave değerinin  $176.9 \pm 3.7$  ile  $217.3 \pm 9.0$  nm arasında değiştiğini, aktif madde yüklemesi ile flurbiprofen nanopartiküllerinin Z-Ave değerinin arttığını bildirilmiştir (Şenel and Öztürk 2019).

Başka bir çalışmada, boş PLGA nanopartiküllerinin Z-Ave değeri  $142.0 \pm 2.6$  nm ile  $154.4 \pm 5.4$  nm arasında değişirken, klaritromisin yüklü PLGA nanopartiküllerinin Z-Ave değeri  $178.7 \pm 1.6$  nm ile  $198.9 \pm 1.5$  nm arasında değiştiği belirlenmiştir (Öztürk, Yenilmez et al., 2019).

Erçin ve arkadaşları, *Laurus nobilis* L. bitki özü yüklü PLGA nanopartiküllerinin  $211.4 \pm 4.031$  nm olduğunu, boş PLGA nanopartiküllerinde Z-Ave değerlerinin ise  $182.4 \pm 0.499$  nm olduğunu bildirmiştir (Ercin, Kecel-Gunduz et al., 2022).

Tablo 4.8 ve Şekil 4.2' de sunulduğu üzere, Boş PLGA nanoformülasyonunda ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunda Z-Ave değerleri sırasıyla  $191.0 \pm 2.41$  nm ve  $212.6 \pm 2.892$  nm aralığında ölçülmüştür. GA yüklemesi ile ortalama nanoparçacık boyutunda yaklaşık 10 nm'lik bir artış olduğu belirlenmiştir.

Bir sıvı içinde kolloidal olarak dağılmış bir sistemin kararlı bir formülasyon olarak kabul edilebilmesi için ZP' nin  $\pm 30$  mV aralığında olması gerekmektedir (Emami, Mohiti et al., 2015; Rigon, Fachinetti et al., 2016; Öztürk, Yenilmez et al., 2020).

Quercetin yüklü PLGA-TPGS nanopartiküllerinin UVB kaynaklı proinflatuar yanıtlara ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, Quercetin yüklü nanopartiküllerin ZP değeri  $-17.00 \pm 0.04$  mV olarak belirlenmiştir (Zhu, Zeng et al., 2016).

İkbal ve arkadaşları, topikal formülasyonlar için hazırlamış oldukları kersetin ve kurkumin yüklü PLGA nanopartiküllerinin ZP değerlerini  $-1.83$  mV ile  $-3.2$  mV arasında olduğunu belirtmişlerdir (Iqbal, Sharif et al., 2021).

Başka bir çalışmada akne tedavisi için hazırlanan timol yüklü PLGA nanopartiküllerinin ZP değerleri  $-22$  ile  $-31$  mV arasında ölçülmüştür (Folle et al., 2021).

PLGA nanoformülasyonunun ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun ait ZP değerleri, Tablo 4.9 ve Şekil 4.3’de sunulduğu üzere, sırasıyla  $-12.10 \pm 0.208$  ve  $-8.44 \pm 0.525$  mV olarak ölçülmüştür. Literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında, hazırlanan nanoformülasyonlar kararlı birer formülasyon olarak kabul edilebilmektedir.

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun morfolojisi ve partikül boyutu SEM cihazı ile ölçüldüğünde, Şekil 4.4’ de sunulduğu üzere, 104 ila 150 nm arasında değişken ve tek tip küresel olarak bulunmuştur. Elde edilen görüntülerden GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun homojen olarak dağıldığı belirlenmiştir.

SEM ve DLS partikül boyutu analiz sonuçlarındaki farklılığın sebebi ise ölçüm metotlarındaki farklı olmasından kaynaklanmaktadır. DLS tekniğinde, ölçülen nanopartikül çapı, parçacıkların difüzyon hızıyla hesaplanmaktadır ve bu da genel olarak daha büyük bir parçacık boyutunun gözlemlenmesiyle sonuçlanmaktadır. SEM tekniğinde partikül boyutu ölçümünde ise kuru numunede elektron demeti-numune etkileşiminden sonra numunenin istenilen çözünürlükte mikrografi elde edilmektedir (Eaton, Quaresma et al., 2017; Ghanei-Motlagh, Taher, 2017; Egil, Ozdemir et al., 2020).

Enkapsülasyon verimi ve yükleme kapasitesi, nanoparçacıkların karakterizasyonu için önemli parametrelerdir.

Zeeshan ve arkadaşları çift emülsiyon yöntemiyle hazırladıkları GA yüklü PLGA nanopartiküllerinin kapsülleme verimini  $\%67,7 \pm \%2,5$  olarak belirlemişlerdir (Zeeshan, Atiq et al., 2021).

Başka bir çalışmada, iki farklı anyonik yüzey aktif madde kullanılarak hazırlanan PLGA nanopartiküllerinin enkapsülasyon verimi  $\% 67 \pm 2$  ile  $\% 26 \pm 1$  arasında, yükleme kapasiteleri ise  $\% 0.1$  ile  $\% 0.7$  arasında hesaplanmıştır (Dos Santos, Rescignano et al., 2017).

Emülsiyon çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanan Karotenoid yüklü PLGA nanoparçacıklarının kapsülleme verimliliği  $\% 96.42 \pm \% 0.73$ , yükleme kapasitesi ise  $\% 7.19 \pm 0.12$  olarak hesaplanmıştır (Hu, Liu et al., 2019).

Bu çalışmada, GA molekülü PLGA polimeri ile başarılı bir şekilde kapsüllenmiş, enkapsülasyon verimi % 81.0 ve yükleme kapasitesi % 26.6 olarak hesaplanmıştır.

Salım profili, etken maddenin ciltte biyolojik olarak kullanılabilir hale gelmeden önce serbest bırakılması gerektiğinden, nanoteknoloji tabanlı formülasyonlar dahil olmak üzere topikal ürünlerin farmasötik performans özellikleri hakkında faydalı bilgiler sağlamaktadır.

Cilt kanseri tedavisine alternatif olarak hazırlanan Kuersetin PLGA nanopartiküllerinin kümülatif salınımı 24 saat sonunda pH 5.6 ve 5.5 için sırasıyla %  $77.87 \pm 1.85$ , %  $79.23 \pm 1.32$  ve %  $69.23 \pm 1.54$ , %  $72.3 \pm 1.72$  olarak ölçülmüştür (Gupta, Kaur et al., 2016).

Başka bir çalışmada, kansere karşı potansiyel kullanımları için hedeflenen ilaç dağıtımı için uzmanlaşmış piperin yüklü PLGA nanokompozitleri, ilaç salınımı pH 5.5'te 312 saat sonunda yaklaşık % 91 oranında meydana gelmiştir (Kaur, Singh et al., 2021).

Akne tedavisine alternatif olarak hazırlanan azelaik asit PLGA nanopartiküllerinin kümülatif salınımı pH 5.5 için 75 saatte % 100 olarak ölçülmüştür (Reis, Gomes et al., 2013).

Tez çalışmasının sonraki adımında, enkapsüle edilen GA' in salım profilini incelemek için insan derisinin pH ortamı simüle edilerek PBS pH=5.5' de *in vitro* salım çalışması gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.5' de sunulduğu üzere, enkapsüle edilen GA ilk 5 saat içinde % 21.4, 24 saat içinde % 67.1 ve 48 saat içinde % 96.4 oranında olmak üzere zamanla kontrollü salınım göstermiştir. Hazırlanan GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun salım profili, literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde topikal uygulama için uygun olarak değerlendirilmiştir.

Bir maddenin genotoksitesinin değerlendirmesi, potansiyel karsinogenez ve genetik anormalliklerin indüklenmesi açısından insan güvenliği ile ilgili olduğundan, taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde önemli ve gerekli bir adımdır (Ahmadi, Gandomi et al., 2021).

Ames testi olarak bilinen, Salmonella bakteri suşu kullanılarak gerçekleştirilen bakteriyel ters mutasyon testi, genotoksik maddeleri tanımlamak için kimya, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde kullanılan hızlı ve basit bir prosedürdür (Levy, Zeiger et al., 2019; Zeiger, 2019). Bu kapsamda formülasyon çalışmalarından önce, GA ve hazırlanan GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun genotoksisitelerinin değerlendirmeleri için Ames testi uygulanmıştır.

Errico ve arkadaşları topikal uygulama için hazırladıkları retinil palmitat yüklü PLGA nanopartiküllerinin Ames testi ile genotoksisitelerini değerlendirmiş, nanopartiküllerin genotoksik olmadığını bildirmişlerdir (Errico, Goñi-de-Cerio et al., 2012).

PLGA nanopartiküllerinin hazırlandığı başka bir çalışmada ise nanopartiküllerin genotoksisitesi değerlendirilmiş ve nanopartiküllerin genotoksik olmadığı tespit edilmiştir (Pandey, Kumar et al., 2021).

Huang ve arkadaşları, poli( $\epsilon$ -kaprolakton)-poli(etilen glikol)-poli( $\epsilon$ -kaprolakton) nanomalzemeleri hazırlamış ve bu nanomalzemelerin *S. typhimurium*'daki genotoksik potansiyellerini TA97, TA98, TA100, TA102 ve TA1535 suşları kullanarak incelemiştir. Sonuçlar, *S. typhimurium* suşlarının hiçbirinin genotoksik olmadığını göstermiştir (Huang, Gao et al. 2010).

PLGA nanokompozitlerinin geliştirildiği başka bir çalışmada, geliştirilen nanomalzemenin *S. typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 suşlarına karşı genotoksik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Krucińska, Żywicka et al., 2017).

Tablo 4.9' da sunulan Ames testi sonuçları değerlendirildiğinde, yükleme kapasitesi değerine göre belirlenen konsantrasyonlarda (0.219, 0.438, 0.875, 1.750 mg/mL) GA ve 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL konsantrasyonlarında GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun genotoksik olmadığı bulunmuştur.

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun genotoksisitesinin değerlendirmesinin ardından GA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun sitotoksisitesi HaCaT hücreleri kullanılarak, MTT testi ile değerlendirilmiştir.

Mosmann tarafından 1983'te geliştirilen MTT testi, yaygın kullanılan hücre canlılığı ve sitotoksikite belirleme yöntemlerinin başında gelmektedir. MTT testi *in vitro* olarak hücrenin yansıma doku kültürlerinde de kullanılmaktadır (Skehan, Storeng et al., 1990; Erkekoğlu, Baydar, 2020).

Literatür çalışmaları incelendiğinde, boş PLGA nanopartiküllerinin MTT testi ile HaCaT hücrelerinde değerlendirildiği ve sitotoksik etkilerinin olmadığı çeşitli çalışmalar mevcuttur.

Cherreddy ve arkadaşları, yara iyileşmesi için geliştirmiş oldukları boş PLGA nanopartiküllerinin ve LL37 yüklü PLGA nanopartiküllerinin sitotoksitelerini HaCaT hücreleri üzerinde MTT testi kullanarak değerlendirmiştir. 500 µg/mL PLGA nanopartiküllerinde ve 500 µg/mL PLGA yüklü LL37 nanopartikül konsantrasyonlarında sitotoksik etki gözlenmediğini raporlamışlardır (Cherreddy, Her et al., 2014).

Julio ve arkadaşları benzer şekilde boş PLGA nanopartikülleri ile iyonik sıvı yüklü PLGA nanopartiküllerini HaCaT hücrelerinde MTT testi ile değerlendirmiştir. Hücre canlılığında azalma olmadığını, sonuçların boş ve yüklü nanopartiküller için benzer olduğunu raporlamışlardır (Júlio, Caparica et al., 2019).

Mota ve arkadaşları, cilt uygulaması için *S.nigra* ekstrakt yüklü PLGA ve PCL nanopartiküllerinde ve serbest ekstraktın potansiyel sitotoksitesini, HaCaT hücrelerinde MTT testi ile değerlendirmiştir. Tüm numuneler için 2.11-33.75 µg rutin/mL konsantrasyon aralığında HaCaT hücrelerinin canlılık çalışmaları yapılmış ve hücre canlılığında herhangi bir değişiklik gözlenmediğini raporlanmıştır (Mota, Duarte et al., 2020).

Şekil 4.6 ve Şekil 4.7'de sunulan, GA ve GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun MTT test sonuçları incelendiğinde, hücre canlılık değerlerinin konsantrasyon arttıkça azalmaya başladığı gözlenmiştir.

GA yüklü PLGA nanoformülasyonunun 0.5 mg/mL' nin üzerindeki konsantrasyonlarının (1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL ve 4.0 mg/mL) düşük toksisiteye neden olduğu bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Bu sebeple, çalışma kapsamında hazırlanacak kremlerdeki en yüksek GA konsantrasyonun 0.5 mg/mL olmasına karar verilmiştir.

UVB, aşırı ROS üretimini indükleyerek, yüksek düzeyde MMP ekspresyonuna neden olarak, kollajenin bozulmasına ve prokollajen sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Krusinska, Hawrysz et al., 2018; Xiao, Yang et al., 2020).

Bu tez çalışması kapsamında, moleküler kenetlenme analizi için, MMP' ların kollajenaz grubu baskın olan MMP-1, stromelisin grubu için MMP-3 ve jelatinaz grubu için MMP-9 gibi üç grubun her birinden bir MMP seçilmiştir (Gentile and Garcovich, 2021; Kim, Jang et al., 2022). GA ve MMP' lar arasındaki doğrudan etkileşimi moleküler bazda ortaya çıkarmak için in silico moleküler kenetlenme analizi yapılmıştır. GA 'in MMP-1 üzerinde inhibisyonu, Tyr240 ile MMP-1' in S1' cebine H bağlama etkileşimleri ve MMP-1' in S3' cebine Asn180 kalıntısı ile H bağlama etkileşimleri elde edilerek gösterilmiştir.

S1' ve S3' cepleri, MMP-1 inhibisyonu için önemli bağlanma bölgeleridir ve literatürde bulunan TRE ve Abalone peptitleri de bu ceplere bağlanarak MMP-1 inhibisyonu sağlamaktadır. GA ve MMP' lar arasındaki en fazla H bağı, en düşük bağlanma enerjisine (-8.64 kcal/mol) karşılık gelen MMP-9' un beş H bağı etkileşimidir.

Yeşil çay özü inhibisyonuna benzer şekilde GA, Ala191 kalıntısı üzerine bağlanarak MMP-9' u inhibe etme yeteneğine de sahiptir. Kenetlenme çalışması, GA' in MMP' lar ile bağlanma etkileşimlerinin anlaşılmasını sağlayarak, MMP' ların inhibisyonuna dayalı olarak cildin foto yaşlanması üzerindeki etkilerin profilini tanımlamaya yardımcı olmuştur.

GA'in MMP hedef proteinleri ile moleküller arası etkileşimleri ve önemli bağlanma etkileşim puanları moleküler kenetlenme analizi ile ortaya çıkarılmış ve bu etkileşimlerin stabilitesi 50 ns dinamik simülasyon analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. GA-MMP komplekslerinin dinamik koşullar altında kararlılığı, MD simülasyonu sonucunda elde edilen parametrelerle değerlendirilmiştir.

GA'in Lipinski kurallarına uymadığı göz önüne alındığında, düşük biyoyararlanımı ile büyük moleküler ağırlığı ve uygun olmayan donör ve alıcı sayıları GA'i tek başına bir ilaç adayı olarak değerlendirmek için zayıf görünmektedir.

Bu nedenle GA, biyoyararlanımını ve verimliliğini artıran bir nanoformülasyonda PLGA ile kapsüllenmiştir.

Cildin, hepatik ilk geçiş etkisinin önlenmesi, ilaç-plazma seviyelerindeki dalgalanmaların en aza indirilmesi, seçici hedefleme potansiyeli, uzun süreli salım profilleri gibi geleneksel oral formülasyonlara göre çok sayıda avantaj sağladığı, ilaçların hem lokalize hem de sistemik dağıtımı için faydası kanıtlanmıştır (Chaturvedi and Garg, 2021).

Ciltte ilaç/etken madde taşınımının oral formülasyonlara göre daha avantajlı olması sebebiyle bu tez çalışmasında geliştirilecek ürünün topikal uygulama için seçilmesine karar verilmiştir.

Düşük çözünürlüğe ve biyoyararlanım sorunlarına sahip ilaçlarda istenen etkiye ulaşmak için daha yüksek miktarda ilaç gerekmektedir. Topikal uygulanan ilaçlarda, kullanım sıklığı ve gerekli dozun artmasıyla birlikte ciltte alerjik reaksiyonlar meydana gelebilmektedir. İlaç etken maddeleri PLGA ile enkapsüle edilerek bu durumun önüne geçilebilmektedir.

Tez çalışmasında, nihai krem formülasyonu geliştirme çalışmaları için literatür araştırmaları yapılarak formülasyonda kullanılacak yardımcı hammaddeler seçilmiştir. Öncelikle beş farklı formülasyon kullanılarak plasebo kremler hazırlanmıştır. Plasebo kremlere organoleptik, pH ve faz ayrımı analizleri yapıldıktan sonra sonuçlar değerlendirilerek en uygun formülasyon nanopartikül içeren formülasyonlar için referans olarak seçilmiştir.

Nanoformülasyon içeren kremlerin hazırlanması aşamasında, öncelikle seçilen plasebo formülasyonu nanoformülasyon içeren krem formülasyonları ile birlikte stabilite kabinlerine alınmak üzere tekrar hazırlanmıştır.

0.25 mg/mL ve 0.50 mg/mL GA yüklü nanoformülasyon içeren krem formülasyonları hazırlandıktan sonra plasebo formülasyonu ile birlikte her üç formülasyon için organoleptik, pH, faz ayrımı ve viskozite analizleri yapılmıştır.

Tez çalışmasının son aşamasında ise, plasebo ve nanoformülasyon içeren kremlerin alüminyum tüpler içerisine 30'ar gramlık dolumları yapılmış ve tüpler  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  % 60 RH,  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  %75 RH koşullarında stabilite kabinlerine kaldırılmıştır. 15.gün. 1.ay. 3.ay zaman periyotlarında başlangıç analizleri tekrarlanmıştır.

$5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ,  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  % 60 RH ve  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  % 75 RH koşullarında stabiliteye kaldırılan kremlerin 15.gün. 1.ay ve 3.ay zaman periyotlarında analiz sonuçları incelendiğinde, kremlerin görünüşlerinde herhangi bir değişiklik olmadığı, bu süreç içerisinde kararlılıklarını koruyarak faz ayırımına uğramadıkları ve viskozite değerlerinde kayda değer bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir.

Ölçülen pH değerleri incelendiğinde ise 3 ay sonunda krem formülasyonlarının pH değerlerinin benzer şekilde azaldığı gözlemlenmiştir.  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  % 75 RH zorlayıcı stabilite koşulundaki azalmanın diğer sıcaklık değerlerine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu koşuldaki pH değerlerinin insan deri pH değerleri aralığında (4.1–5.8) olmaması sebebiyle,  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  % 75 RH koşulunun uygun saklama koşulu olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında anti aging özellikli topikal uygulamaya uygun GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonunun geliştirilmesi, stabilitelerinin değerlendirilmesi, *in vitro* güvenliğinin, *in vitro* ve *in silico* etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, bu tez çalışması kapsamında geliştirilmiş olan farklı konsantrasyonlarda GA yüklü PLGA nanoformülasyonu içeren krem formülasyonlarının hem fizikokimyasal kararlılıkları hem de biyolojik aktiviteleri ile anti aging cilt bakım ürünü adayı olarak kullanılabileceklerinin kanaatine varılmıştır.



- Afnan, Q., et al. (2012). "Glycyrrhizic acid (GA), a triterpenoid saponin glycoside alleviates ultraviolet-B irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts." *Phytomedicine* 19(7): 658-664.
- Ahmadi, A., et al. (2021). "Phytochemical composition and in vitro safety evaluation of *Ziziphora clinopodioides* Lam. ethanolic extract: Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity assessment." *Journal of Ethnopharmacology* 266: 113428.
- Akhtar, M. S., et al. (2022). "Comparative phytochemical, thin layer chromatographic profiling and antioxidant activity of extracts from some Indian herbal drugs." *Journal of Bioresources and Bioproducts* 7(2): 128-134.
- Alcaraz, L. A., et al. (2007). "Matrix metalloproteinase–inhibitor interaction: the solution structure of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase-3 with different inhibitors." *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 12(8): 1197-1206.
- Ali, A., et al. (2022). "Relationship between sensorial and physical characteristics of topical creams: A comparative study on effects of excipients." *International journal of pharmaceutics* 613: 121370.
- Amberg, N. and C. Fogarassy (2019). "Green consumer behavior in the cosmetics market." *Resources* 8(3): 137.
- Ansary, T. M., Hossain, M. R., Kamiya, K., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2021). Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3974.
- Annunziata, M. C., et al. (2020). "Urea-containing topical formulations." *International Journal of Clinical Practice* 74: e13660.
- Ansari, F., et al. (2020). "Effect of emulsifiers on drying stress and intercellular cohesion in human stratum corneum." *International Journal of Cosmetic Science* 42(6): 581-589.
- Ansary, T. M., et al. (2021). "Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging." *International Journal of Molecular Sciences* 22(8): 3974.
- Anwer, M. K., et al. (2019). "Preparation of sustained release apremilast-loaded PLGA nanoparticles: In vitro characterization and in vivo pharmacokinetic study in rats." *International journal of nanomedicine* 14: 1587.
- Arora, N., et al. (2012). "Latest technology advances in cosmaceuticals." *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res* 4(3): 168-182.
- Arora, P., et al. (2019). "Community structure, spatial distribution, diversity and functional characterization of culturable endophytic fungi associated with *Glycyrrhiza glabra* L." *Fungal biology* 123(5): 373-383.

- Ashaolu, T. J. (2021). "Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: A review." *Environmental Chemistry Letters* 19(4): 3381-3395.
- Averilla, J. N., et al. (2019). "Carbon monoxide partially mediates protective effect of resveratrol against UVB-induced oxidative stress in human keratinocytes." *Antioxidants* 8(10): 432.
- Banerjee, P., et al. (2018). "ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals." *Nucleic acids research* 46(W1): W257-W263.
- Barnes, T. M., et al. (2021). "Vehicles for Drug Delivery and Cosmetic Moisturizers: Review and Comparison." *Pharmaceutics* 13(12): 2012.
- Bielach-Bazyluk, A., et al. (2021). "Sirtuin 1 and skin: implications in intrinsic and extrinsic aging—a systematic review." *Cells* 10(4): 813.
- Bisso, S. and J.-C. Leroux (2020). "Nanopharmaceuticals: A focus on their clinical translatability." *International journal of pharmaceutics* 578: 119098.
- Bolke, L., et al. (2019). "A collagen supplement improves skin hydration, elasticity, roughness, and density: Results of a randomized, placebo-controlled, blind study." *Nutrients* 11(10): 2494.
- Bowers, K. J., et al. (2006). Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters. *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE Conference on Supercomputing*.
- Brito Raj, S., et al. (2019). "Formulation, in-vitro and in-vivo pharmacokinetic evaluation of simvastatin nanostructured lipid carrier loaded transdermal drug delivery system." *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 5(1): 1-14.
- Budama-Kilinc, Y. (2019). "Piperine nanoparticles for topical application: Preparation, characterization, in vitro and in silico evaluation." *ChemistrySelect* 4(40): 11693-11700.
- Burley, S. K., et al. (2021). "RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences." *Nucleic acids research* 49(D1): D437-D451.
- Camodeca, C., et al. (2016). "Discovery of a new selective inhibitor of A Disintegrin And Metalloprotease 10 (ADAM-10) able to reduce the shedding of NKG2D ligands in Hodgkin's lymphoma cell models." *European Journal of Medicinal Chemistry* 111: 193-201.
- Castellano-Pellicena, I., et al. (2021). "Melanin distribution in human skin: Influence of cytoskeletal, polarity, and centrosome-related machinery of stratum basale keratinocytes." *International Journal of Molecular Sciences* 22(6): 3143.

- Chaturvedi, S. and A. Garg (2021). "An insight of techniques for the assessment of permeation flux across the skin for optimization of topical and transdermal drug delivery systems." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 62: 102355.
- Chaudhari, S. P. and S. U. Gaikwad (2020). "Sphingosomes: A Novel Lipoidal Vesicular Drug Delivery System." *System* 5(04).
- Chauhan, L. and S. Gupta (2020). "Creams: a review on classification, preparation methods, evaluation and its applications." *Journal of Drug Delivery and Therapeutics* 10(5-s): 281-289.
- Chen, J., et al. (2019). "Antiphotaging effect of boiled abalone residual peptide ATPGDEG on UVB-induced keratinocyte HaCaT cells." *Food & nutrition research* 63.
- Chen, M.-F., et al. (2019). "Preventive effect of YGDEY from tilapia fish skin gelatin hydrolysates against alcohol-induced damage in HepG2 cells through ROS-mediated signaling pathways." *Nutrients* 11(2): 392.
- Cherreddy, K. K., et al. (2014). "PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing." *Journal of Controlled Release* 194: 138-147.
- Clarke, S. (2013). *Development of hierarchical magnetic nanocomposite materials for biomedical applications*, Dublin City University.
- Daina, A., et al. (2017). "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules." *Scientific reports* 7(1): 1-13.
- Danaei, M., et al. (2018). "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems." *Pharmaceutics* 10(2): 57.
- Daood, N. M., et al. (2019). "Studying the effect of different gelling agent on the preparation and characterization of metronidazole as topical emulgel." *Asian J Pharm Clin Res* 12(3): 571-577.
- Darvin, M. E., et al. (2022). "Current Views on Noninvasive in vivo Determination of Physiological Parameters of the Stratum Corneum Using Confocal Raman Microspectroscopy." *Skin pharmacology and physiology* 35(3): 125-136.
- Dave, V., et al. (2017). "Hybrid nanoparticles for the topical delivery of norfloxacin for the effective treatment of bacterial infection produced after burn." *Journal of microencapsulation* 34(4): 351-365.
- Dhawan, S., et al. (2020). *Cosmetic nanoformulations and their intended use. Nanocosmetics*, Elsevier: 141-169.
- DJIOBIE TCHIENOU, G. E., et al. (2018). "Multi-response optimization in the formulation of a topical cream from natural ingredients." *Cosmetics* 5(1): 7.

- Dos Santos, T. C., et al. (2017). "In vitro antiherpes effect of C-glycosyl flavonoid enriched fraction of *Cecropia glaziovii* encapsulated in PLGA nanoparticles." *Materials Science and Engineering: C* 75: 1214-1220.
- Eaton, P., et al. (2017). "A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles." *Ultramicroscopy* 182: 179-190.
- Egil, A. C., et al. (2020). "Synthesis, characterization, biological activities and molecular docking of *Epilobium parviflorum* aqueous extract loaded chitosan nanoparticles." *International Journal of Biological Macromolecules* 161: 947-957.
- El-Saber Batiha, G., et al. (2020). "Traditional uses, bioactive chemical constituents, and pharmacological and toxicological activities of *Glycyrrhiza glabra* L.(Fabaceae)." *Biomolecules* 10(3): 352.
- Emami, J., et al. (2015). "Formulation and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for pulmonary delivery of budesonide using Taguchi and Box-Behnken design." *Research in pharmaceutical sciences* 10(1): 17.
- Ercin, E., et al. (2022). "Laurus nobilis L. Essential Oil-Loaded PLGA as a Nanoformulation Candidate for Cancer Treatment." *Molecules* 27(6): 1899.
- Erkekoğlu, P. and T. BAYDAR (2020). "Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri." *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 41(1): 45-63.
- Errico, C., et al. (2012). "Retinyl palmitate-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles for the topical treatment of skin diseases." *Journal of bioactive and compatible polymers* 27(6): 604-620.
- Esposito, L., et al. (2020). "Design and characterization of sodium alginate and poly (vinyl) alcohol hydrogels for enhanced skin delivery of quercetin." *Pharmaceutics* 12(12): 1149.
- Eyerich, S., et al. (2018). "Cutaneous barriers and skin immunity: differentiating a connected network." *Trends in immunology* 39(4): 315-327.
- Faria-Silva, C., et al. (2020). "Feeding the skin: A new trend in food and cosmetics convergence." *Trends in Food Science & Technology* 95: 21-32.
- Fenner, J. and R. Clark (2016). "Anatomy, physiology, histology, and immunohistochemistry of human skin." *Skin tissue engineering and regenerative medicine* 1.
- Fernando, R. (2021). "A Comprehensive Review on Web Based Application for Herbal Cosmetics."
- Ferreira, M. S., et al. (2021). "Trends in the use of botanicals in anti-aging cosmetics." *Molecules* 26(12): 3584.
- FDA. (2018). "Drug Administration: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm064982.htm>, retrieved on May 8th.

- FDA, Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm> (accessed on 28 October 2022).
- Freeman, S. C. and S. Sonthalia (2019). "Histology, keratohyalin granules."
- Ganceviciene, R., et al. (2012). "Skin anti-aging strategies." *Dermato-endocrinology* 4(3): 308-319.
- Garg, T., et al. (2015). "Comprehensive review on additives of topical dosage forms for drug delivery." *Drug Delivery* 22(8): 969-987.
- Gentile, P. and S. Garcovich (2021). "Adipose-derived mesenchymal stem cells (AD-MSCs) against ultraviolet (UV) radiation effects and the skin photoaging." *Biomedicines* 9(5): 532.
- Ghanei-Motlagh, M. and M. Taher (2017). "Novel imprinted polymeric nanoparticles prepared by sol-gel technique for electrochemical detection of toxic cadmium (II) ions." *Chemical Engineering Journal* 327: 135-141.
- Ghitman, J., et al. (2020). "Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine." *Materials & Design* 193: 108805.
- Gilaberte, Y., et al. (2016). *Anatomy and Function of the Skin. Nanoscience in Dermatology*, Elsevier: 1-14.
- González-Minero, F. J. and L. Bravo-Díaz (2018). "The use of plants in skin-care products, cosmetics and fragrances: Past and present." *Cosmetics* 5(3): 50.
- Guideline, I. H. T. (2005). "Validation of analytical procedures: text and methodology." *Q2 (R1)* 1(20): 05.
- Gunnarsson, M., et al. (2021). "Extraction of natural moisturizing factor from the stratum corneum and its implication on skin molecular mobility." *Journal of Colloid and Interface Science* 604: 480-491.
- Gupta, A., et al. (2016). "Formulation, characterization, and evaluation of ligand-conjugated biodegradable quercetin nanoparticles for active targeting." *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 44(3): 960-970.
- Gutiérrez-Valenzuela, C. A., et al. (2018). "Evaluation of a combined emulsion process to encapsulate methylene blue into PLGA nanoparticles." *RSC advances* 8(1): 414-422.
- Hayta, S. B. and M. Akyol. (2018). "Nanoteknolojinin dermatoloji alanında kullanımı." *Güncel Dermatoloji Dergisi* 3(2): 44-55.
- Hooda, R. (2015). "Antiwrinkle herbal drugs-an update." *Journal of pharmacognosy and phytochemistry* 4(4): 277.
- Hu, F., et al. (2019). "Optimization and characterization of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with astaxanthin and evaluation of anti-photodamage effect in vitro." *Royal Society open science* 6(10): 191184.

- Huang, Y., et al. (2010). "Acute toxicity and genotoxicity studies on poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-poly (ethylene glycol)-poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanomaterials." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 696(2): 101-106.
- Hwa, C., et al. (2011). "Skin biology." *Dermatologic therapy* 24(5): 464-470.
- Hwang, J.-K. (2010). "Effects of macelignan isolated from *Myristica fragrans* Houtt. on UVB-induced matrix metalloproteinase-9 and cyclooxygenase-2 in HaCaT cells." *Journal of dermatological science* 57(2): 114-122.
- Iqbal, K., et al. (2021). "Preparation, characterization and in vivo wound healing study of topical formulations of curcumin and quercetin loaded PLGA nanoparticles." *J. Toxicol. Pharmaceut. Sci.* 5(1): 11-17.
- Iqbal, M., et al. (2015). "Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation." *International journal of pharmaceutics* 496(2): 173-190.
- İSTANBULLUOĞLU, S., et al. "Kozmetiklerde Kullanılan Biyoteknolojik Etkin ve Yardımcı Maddeler." *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 39(2): 98-112.
- Ito, F., et al. (2013). "Possibility for the development of cosmetics with PLGA nanospheres." *Drug development and industrial pharmacy* 39(5): 752-761.
- Jia, C.-Y., et al. (2020). "A drug-likeness toolbox facilitates ADMET study in drug discovery." *Drug Discovery Today* 25(1): 248-258.
- Jose, J. and G. Netto (2019). "Role of solid lipid nanoparticles as photoprotective agents in cosmetics." *Journal of cosmetic dermatology* 18(1): 315-321.
- Joshi, L. S. and H. A. Pawar (2015). "Herbal cosmetics and cosmeceuticals: An overview." *Nat Prod Chem Res* 3(2): 170.
- Júlio, A., et al. (2019). "Ionic liquid-polymer nanoparticle hybrid systems as new tools to deliver poorly soluble drugs." *Nanomaterials* 9(8): 1148.
- Kandil, S. M., et al. (2022). "Magnesium ascorbyl phosphate vesicular carriers for topical delivery; preparation, in-vitro and ex-vivo evaluation, factorial optimization and clinical assessment in melasma patients." *Drug Delivery* 29(1): 534-547.
- KAPTANOĞLU, A. F. (2013). "Kozmetikler ve Nanoteknoloji." *Türkiye Klinikleri J Cosm Dermatol-Special Topics* 6(4): 59-66.
- Kar, S. and J. Leszczynski (2020). "Open access in silico tools to predict the ADMET profiling of drug candidates." *Expert opinion on drug discovery* 15(12): 1473-1487.
- Kaur, A., et al. (2020). "Novel herbs used in cosmetics for skin and hair care: A review." *Plant Arch* 20(1): 3784-3793.

- Kaur, J., et al. (2021). "Piperine-Loaded PLGA Nanoparticles as Cancer Drug Carriers." *ACS Applied Nano Materials* 4(12): 14197-14207.
- Kaur, L., et al. (2021). "A brief review on ethnobotanical, pharmaceutical and therapeutical uses of *Glycyrrhiza glabra*." *seeds* 49: 50.
- Ke, Y. and X.-J. Wang (2021). "TGF $\beta$  signaling in photoaging and UV-induced skin cancer." *Journal of Investigative Dermatology* 141(4): 1104-1110.
- Keaney, T. C. (2016). "Aging in the male face: intrinsic and extrinsic factors." *Dermatologic Surgery* 42(7): 797-803.
- Khare, S., et al. (2021). "A Mini Review-Pharmaceutical Creams." *Sch Acad J Pharm* 4: 60-62.
- Khezri, K., et al. (2018). "Application of nanoparticles in percutaneous delivery of active ingredients in cosmetic preparations." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106: 1499-1505.
- Kim, B., et al. (2020). "Transdermal delivery systems in cosmetics." *Biomedical Dermatology* 4(1): 1-12.
- Kim, H., et al. (2022). "Inhibition of matrix metalloproteinase expression by selective clearing of senescent dermal fibroblasts attenuates ultraviolet-induced photoaging." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 150: 113034.
- Kim, S., et al. (2021). "PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces." *Nucleic acids research* 49(D1): D1388-D1395.
- Krucńska, I., et al. (2017). "Biological properties of low-toxicity PLGA and PLGA/PHB fibrous nanocomposite implants for osseous tissue regeneration. Part I: Evaluation of potential biotoxicity." *Molecules* 22(12): 2092.
- Krusinska, B., et al. (2018). "Associations of Mediterranean diet and a posteriori derived dietary patterns with breast and lung cancer risk: A case-control study." *Nutrients* 10(4): 470.
- Kushwaha, N., et al. (2020). "Use of nanotechnology in cosmeceuticals: a review." *Int J Pharm Sci Invent* 9: 43-51.
- Lai-Cheong, J. E. and J. A. McGrath (2017). "Structure and function of skin, hair and nails." *Medicine* 45(6): 347-351.
- Lee, A., et al. (2016). "Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery." *Expert opinion on drug discovery* 11(7): 707-715.
- Lephart, E. D. (2018). "Equol's anti-aging effects protect against environmental assaults by increasing skin antioxidant defense and ECM proteins while decreasing oxidative stress and inflammation." *Cosmetics* 5(1): 16.
- Levy, D. D., et al. (2019). "Recommended criteria for the evaluation of bacterial mutagenicity data (Ames test)." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 848: 403074.

- Li, J.-y., et al. (2014). "Glycyrrhizic acid in the treatment of liver diseases: literature review." *BioMed research international* 2014.
- Li, Z., et al. (2020). "New insights into the skin microbial communities and skin aging." *Frontiers in microbiology* 11: 565549.
- Locatelli, E. and M. Comes Franchini (2012). "Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system." *Journal of Nanoparticle Research* 14(12): 1-17.
- Lovejoy, B., et al. (1999). "Crystal structures of MMP-1 and-13 reveal the structural basis for selectivity of collagenase inhibitors." *Nature structural biology* 6(3): 217-221.
- Macalino, S. J. Y., et al. (2015). "Role of computer-aided drug design in modern drug discovery." *Archives of pharmacal research* 38(9): 1686-1701.
- Maron, D. M. and B. N. Ames (1983). "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 113(3-4): 173-215.
- Mayba, J. N. and M. J. Gooderham (2018). "A guide to topical vehicle formulations." *Journal of cutaneous medicine and surgery* 22(2): 207-2.
- McNutt, A. T., et al. (2021). "GNINA 1.0: molecular docking with deep learning." *Journal of cheminformatics* 13(1): 1-20.
- Mehlich, A., et al. (2021). "Acidification of the skin and maintenance of the physiological skin pH value by buffered skin care products formulated around pH 4." *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications* 11(01): 44.
- Mesa-Arango, A. C., et al. (2017). "Mechanisms of skin aging." *Iatreia* 30(2): 160-170.
- Mir, M., et al. (2017). "Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 159: 217-231.
- Mitura, S., et al. (2020). "Biopolymers for hydrogels in cosmetics." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 31(6): 1-14.
- Mohiuddin, A. (2019). "An extensive review of cosmetics in use." *Am J Dermatol Res Rev* 2: 7.
- Molinspiration. (2022). *Molinspiration Cheminformatics Software*. <https://www.molinspiration.com/>
- Montenegro, L., et al. (2015). "Effects of lipids and emulsifiers on the physicochemical and sensory properties of cosmetic emulsions containing vitamin E." *Cosmetics* 2(1): 35-47.
- Mordor, I. *Dermatological Therapeutics Market / Growth, Trends, and Forecast (2019–2024)*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/dermatological-therapeutics-market> (accessed on 20 October 2022).



- Moreci, R. S. and T. Lechler (2020). "Epidermal structure and differentiation." *Current Biology* 30(4): R144-R149.
- Mota, A. H., et al. (2020). "Further evidence of possible therapeutic uses of *Sambucus nigra* L. extracts by the assessment of the in vitro and in vivo anti-inflammatory properties of its PLGA and PCL-based nanoformulations." *Pharmaceutics* 12(12): 1181.
- Mota, A. H., et al. (2018). "Design and evaluation of novel topical formulation with olive oil as natural functional active." *Pharmaceutical development and technology* 23(8): 794-805.
- Mota, A. H., et al. (2020). Natural-based consumer health nanoproducts: Medicines, cosmetics, and food supplements. *Handbook of functionalized nanomaterials for industrial applications*, Elsevier: 527-578.
- N. C. f. B. Information. PubChem Compound Summary for CID 14982, Glycyrrhizic acid [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glycyrrhizic-acid>
- Nanda, S., et al. (2015). *Nanocosmetics: fundamentals, safety and regulatory aspects*, Studium Press, LLC, TX, USA: 453-483.
- Nanda, S., et al. (2016). *Nanocosmetics: performance enhancement and safety assurance. Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics*, Elsevier: 47-67.
- Nanda, S., et al. (2015). *Federal perspectives of nanostructured systems: an update*, Studium Press, LLC, TX, USA: 491-525.
- Napagoda, M. T., et al. (2016). "Photoprotective potential in some medicinal plants used to treat skin diseases in Sri Lanka." *BMC complementary and alternative medicine* 16(1): 1-6.
- Nascimento, M. H. M. d. and D. R. de Araújo (2022). "Exploring the Pharmacological Potential of Glycyrrhizic Acid: From Therapeutic Applications to Trends in Nanomedicine." *Future Pharmacology* 2(1): 1-15.
- Nguyen, T. A. and S. Rajendran (2020). *Current commercial nanocosmetic products*. *Nanocosmetics*, Elsevier: 445-453.
- Niehues, H., et al. (2018). "3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function." *Experimental dermatology* 27(5): 501-511.
- O'Connor, C., et al. (2021). "Shedding light on the myths of ultraviolet radiation in the COVID-19 pandemic." *Clinical and Experimental Dermatology*.
- Öztürk, A. A., et al. (2019). "Clarithromycin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and surface modification with chitosan on formulation, nanoparticle characterization and antibacterial effects." *Polymers* 11(10): 1632.

- Öztürk, A. A., et al. (2020). "Effect of different molecular weight PLGA on flurbiprofen nanoparticles: formulation, characterization, cytotoxicity, and in vivo anti-inflammatory effect by using HET-CAM assay." *Drug development and industrial pharmacy* 46(4): 682-695.
- Pandey, A. K., et al. (2021). "In vitro and in vivo evaluation of clastogenicity of second-line antitubercular drug loaded PLGA nanoparticles." *Human & Experimental Toxicology* 40(7): 1064-1073.
- Panich, U., et al. (2016). "Ultraviolet radiation-induced skin aging: the role of DNA damage and oxidative stress in epidermal stem cell damage mediated skin aging." *Stem cells international* 2016.
- Park, B., et al. (2018). "Eucalyptus globulus extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via regulation of TGF- $\beta$ /Smad signals and attenuation of AP-1." *Archives of biochemistry and biophysics* 637: 31-39.
- Paul, P. S., et al. (2022). "Unconjugated PLGA nanoparticles attenuate temperature-dependent  $\beta$ -amyloid aggregation and protect neurons against toxicity: implications for Alzheimer's disease pathology." *Journal of nanobiotechnology* 20(1): 1-26.
- Pinzi, L. and G. Rastelli (2019). "Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery." *International Journal of Molecular Sciences* 20(18): 4331.
- Pires, D. E., et al. (2015). "pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures." *Journal of medicinal chemistry* 58(9): 4066-4072.
- Proksch, E. (2018). "pH in nature, humans and skin." *The Journal of dermatology* 45(9): 1044-1052
- Proksch, E., et al. (2019). "Influence of buffers of different pH and composition on the murine skin barrier, epidermal proliferation, differentiation, and inflammation." *Skin pharmacology and physiology* 32(6): 328-336.
- Rattanawiwatpong, P., et al. (2020). "Anti-aging and brightening effects of a topical treatment containing vitamin C, vitamin E, and raspberry leaf cell culture extract: a split-face, randomized controlled trial." *Journal of cosmetic dermatology* 19(3): 671-676.
- RCSB. (2022). *Protein Data Bank*. <https://www.rcsb.org/>
- Reis, C. P., et al. (2013). "Development and evaluation of a novel topical treatment for acne with azelaic acid-loaded nanoparticles." *Microscopy and Microanalysis* 19(5): 1141-1150.
- Release, S. (2017). "1: Maestro." Schrödinger, LLC, New York, NY 2017.
- Rigon, R. B., et al. (2016). "Skin delivery and in vitro biological evaluation of trans-resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for skin disorder therapies." *Molecules* 21(1): 116.

- Roberts, R., et al. (2020). "Development of PLGA nanoparticles for sustained release of a connexin43 mimetic peptide to target glioblastoma cells." *Materials Science and Engineering: C* 108: 110191.
- Roointan, A., et al. (2018). "Poly (lactic-co-glycolic acid): The most ardent and flexible candidate in biomedicine!" *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 67(17): 1028-1049.
- Sadozai, S. K., et al. (2020). "Ketoconazole-loaded PLGA nanoparticles and their synergism against *Candida albicans* when combined with silver nanoparticles." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 56: 101574.
- Sahle, F. F., et al. (2015). "Skin diseases associated with the depletion of stratum corneum lipids and stratum corneum lipid substitution therapy." *Skin pharmacology and physiology* 28(1): 42-55.
- Salvioni, L., et al. (2021). "The emerging role of nanotechnology in skincare." *Advances in Colloid and Interface Science* 293: 102437.
- Samdavid Thanapaul, R. J. R., et al. (2022). *Nanobiotechnology-Based Anti-aging Products. Handbook of Consumer Nanoproducts*, Springer: 1005-1029
- Sample, A. and Y. Y. He (2017). "Autophagy in UV damage response." *Photochemistry and photobiology* 93(4): 943-955.
- Sarheed, O., et al. (2021). "Fabrication of alginate-based O/W nanoemulsions for transdermal drug delivery of lidocaine: Influence of the oil phase and surfactant." *Molecules* 26(9): 2556.
- Sarkar, J., et al. (2016). "Inhibition of MMP-9 by green tea catechins and prediction of their interaction by molecular docking analysis." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84: 340-347.
- Selyutina, O. Y. and N. Polyakov (2019). "Glycyrrhizic acid as a multifunctional drug carrier—From physicochemical properties to biomedical applications: A modern insight on the ancient drug." *International journal of pharmaceutics* 559: 271-279.
- Sharma, V., et al. (2018). *Emulgels. Polymeric Gels*, Elsevier: 251-264
- Sheskey P.J., Cook W.G., Cable C.G.,(2017). *Handbook of pharmaceutical excipients*. 8th ed. London, England.
- Silvera-Tawil, D., et al. (2015). "Artificial skin and tactile sensing for socially interactive robots: A review." *Robotics and Autonomous Systems* 63: 230-243.
- Singh, A., et al. (2018). "Application of molecular dynamic simulation to study food proteins: A review." *Critical reviews in food science and nutrition* 58(16): 2779-2789.
- Siracusa, L., et al. (2011). "Phytocomplexes from liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) leaves—Chemical characterization and evaluation of their antioxidant, anti-genotoxic and anti-inflammatory activity." *Fitoterapia* 82(4): 546-556.

- Skehan, P., et al. (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 82(13): 1107-1112.
- Sonneville-Aubrun, O., et al. (2018). "Nanoemulsions Formulation, Applications, and Characterization."
- Souto, E. B., et al. (2020). "SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery." *Expert opinion on drug delivery* 17(3): 357-377.
- Souto, E. B., et al. (2020). "(+)-Limonene 1, 2-epoxide-loaded slns: Evaluation of drug release, antioxidant activity, and cytotoxicity in an HaCaT cell line." *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1449.
- Sravika, N., et al. (2021). "Swiss ADME properties screening of the phytochemical compounds present in *Bauhinia acuminata*." *Journal of pharmacognosy and phytochemistry* 10(4): 411-419.
- Strzałka, W., et al. (2020). "The dark side of UV-induced DNA lesion repair." *Genes* 11(12): 1450.
- Su, X., et al. (2017). "Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 95: 670-678.
- Sun, L., et al. (2017). "Enhanced topical penetration, system exposure and anti-psoriasis activity of two particle-sized, curcumin-loaded PLGA nanoparticles in hydrogel." *Journal of Controlled Release* 254: 44-54
- Statista, Global market value for natural and organic cosmetics and personal care from 2021 to 2027. <https://www.statista.com/statistics/673641/global-market-value-for-natural-cosmetics> (accessed on 20 October 2022).
- Suryawanshi, S. S., Patil, P. P., Gaikwad, R. G., Mali, S. S., & Pol, S. L. (2021). Proniosomes: Modern drug delivery system. *Pharm. Res*, 4(1), 7-18.
- Şenel, B. and A. A. Öztürk (2019). "New approaches to tumor therapy with siRNA-decorated and chitosan-modified PLGA nanoparticles." *Drug development and industrial pharmacy* 45(11): 1835-1848.
- Tewari, D., et al. (2017). "Ethnopharmacological approaches for therapy of jaundice: Part II. Highly used plant species from Acanthaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Combretaceae, and Fabaceae families." *Frontiers in pharmacology* 8: 519.
- Thatai, P. and A. B. Khan (2020). "Management of nail psoriasis by topical drug delivery: a pharmaceutical perspective." *International Journal of Dermatology* 59(8): 915-925.
- Torres, P. H., et al. (2019). "Key topics in molecular docking for drug design." *International Journal of Molecular Sciences* 20(18): 4574.
- Twentify. ( 2021, Şubat ) *Çalışan kadınların giyim ve kozmetik alışkanlıkları.* <https://www.twentify.com/tr/raporlar/calisan-kadin-giyim-kozmetik-subat-2021>

- Vieira, M. V., et al. (2021). "Preparation and characterization of Haematococcus pluvialis carotenoid-loaded PLGA nanocapsules in a gel system with antioxidant properties for topical application." *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 61: 102099.
- Voshavar, C., et al. (2019). "Topical and Transdermal Delivery with Chemical Enhancers and Nanoparticles." *Imaging Technologies and Transdermal Delivery in Skin Disorders*: 169-200.
- Wojciechowska, K., et al. (2021). "Comparison of sensory and rheological properties of green cosmetic creams prepared on different natural, ECOCERT and BDIH certificated self-emulsifying bases." *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* 34(4): 218-223.
- Woo, W. M. (2019). "Skin structure and biology." *Imaging Technologies and Transdermal Delivery in Skin Disorders*: 1-14.
- Xiao, Z., et al. (2020). "Trehalose against UVB-induced skin photoaging by suppressing MMP expression and enhancing procollagen I synthesis in HaCaT cells." *Journal of Functional Foods* 74: 104198.
- XSIGHT. (2021, Aralık) *Doğal Kozmetik/ Dermokozmetik Sektör Raporu*. [https://www.xsights.co.uk/upload/data/files/organik\\_kozmetik\\_sektor\\_raporu\\_1.pdf](https://www.xsights.co.uk/upload/data/files/organik_kozmetik_sektor_raporu_1.pdf).
- Yadav, S., et al. (2017). "Topical emulgel of tolinaftate with penetration enhancer: development, characterisation and antifungal activity." *Indian J Med Res Pharm Sci* 4(10): 28-35.
- Yang, H., et al. (2018). "ADMETopt: a web server for ADMET optimization in drug design via scaffold hopping." *Journal of chemical information and modeling* 58(10): 2051-2056.
- Yang, J.-E., et al. (2019). "Dietary enzyme-treated Hibiscus syriacus L. protects skin against chronic UVB-induced photoaging via enhancement of skin hydration and collagen synthesis." *Archives of biochemistry and biophysics* 662: 190-200.
- Yapar, E. A. (2017). "Herbal cosmetics and novel drug delivery systems." *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research* 51(3): 152-158.
- YAPAR, E. A. and S. T. TANRIVERDİ (2016). "YAŞLANMA KARŞITI KOZMETİK YAKLAŞIMLAR VE ÜRÜN BİLEŞENLERİ." *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 5(2): 99-109.
- Yousef, H., et al. (2017). "Anatomy, skin (integument), epidermis."
- Yuan, H., et al. (2013). "Synthesis of derivatives of methyl rosmarinate and their inhibitory activities against matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)." *European Journal of Medicinal Chemistry* 62: 148-157.
- Zagórska-Dziok, M., et al. (2020). "Antioxidant activity and cytotoxicity of Medicago sativa L. seeds and herb extract on skin cells." *BioResearch Open Access* 9(1): 229-242.

- Zeeshan, M., et al. (2021). "Evaluating the mucoprotective effects of glycyrrhizic acid-loaded polymeric nanoparticles in a murine model of 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis via suppression of inflammatory mediators and oxidative stress." *Inflammopharmacology* 29(5): 1539-1553.
- Zeiger, E. (2019). "The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 841: 43-48.
- Zhang, S. and E. Duan (2018). "Fighting against skin aging: the way from bench to bedside." *Cell transplantation* 27(5): 729-738.
- Zhang, W., et al. (2010). "Penetration and distribution of PLGA nanoparticles in the human skin treated with microneedles." *International journal of pharmaceutics* 402(1-2): 205-212.
- Zhao, X., et al. (2019). "A simple injectable moldable hydrogel assembled from natural glycyrrhizic acid with inherent antibacterial activity." *ACS Applied Bio Materials* 3(1): 648-653.
- Zhou, H., et al. (2021). "Current Advances of Nanocarrier Technology-Based Active Cosmetic Ingredients for Beauty Applications." *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* 14: 867.
- Zhu, X., et al. (2016). "The effects of quercetin-loaded PLGA-TPGS nanoparticles on ultraviolet B-induced skin damages in vivo." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12(3): 623-632.
- Zielińska, A., et al. (2020). "Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology." *Molecules* 25(16): 3731.

## TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

---

### Konferans Bildirileri

1.Cetin-Aluc, C., Gok, B., Budama-Kilinc, Y. (2022). Preparation and Characterization of Glycyrrhizic Acid Loaded PLGA Nanoparticles for Anti Aging Cosmetic Applications. The Sixth International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Sciences. Gaziantep, Türkiye.

### Makaleler

1. Aluc, C. C., Gok, B., Kecel-Gunduz, S., & Budama-Kilinc, Y. (2022). Glycyrrhizic acid Poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: anti-aging cosmeceutical formulation for topical applications. PeerJ, 10, e14139.