

TUĞBA KAMAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST. YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023

TUĞBA KAMAN

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

YÜKSEK LİSANS TEZİ;

2023

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**UÇUK ÜZERİNDE ETKİLİ BİTKİSEL KAYNAKLI
ANTİVİRALLERİ İÇEREN TOPİKAL NANOEMÜLJEL
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

TUĞBA KAMAN

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ EBRU ALTUNTAŞ**

**FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
KOZMETOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2023

TEZ ONAYI



BEYAN



İTHAF

Rahmetli babama ithafen.



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında akademik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili danışman hocam Dr. Öğ. Üyesi Ecz. Ebru ALTUNTAŞ'a,

Tez çalışmamın gerçekleşmesine imkan sunan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Yıldız Özsoy Erginer'e,

Kozmetoloji Yüksek Lisans eğitimimde bilgi ve tecrübeleriyle desteğini her zaman hissettiğim hocalarım Sayın Prof. Dr. Gülgün Yener'e ve Prof. Dr. Ümit Gönüllü'ye,

Etkinlik testleri çalışmalarında desteklerinden dolayı Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi mikrobiyoloji AD ve Tıbbi Viroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa Altındış, Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji A.B.D Prof. Dr. Sibel Yavru ve Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Viroloji A.B.D doktora öğrencisi Hasan Sercan Palancı'ya,

Deney çalışmalarım süresince katkılarından dolayı İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 4. Sınıf Öğrencisi ve geleceğin kıymetli Eczacısı Merve Yılmaz'a ve Farmasötik Teknoloji ABD doktora öğrencisi Zakaria Ouzaid'e

Ve hayatımın her aşamasında beni destekleyen sevgili aileme, eşime ve biricik oğluma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2023-39717

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Derinin Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2. Herpes simpleks virüs (HSV).....	8
2.2.1. Klasik Tedavi Yöntemleri.....	9
2.2.2. HSV üzerine Etkili Uçucu Yağlar.....	10
2.2.2.1. Melisa Uçucu Yağı.....	12
2.2.2.2. Yıldız Anason Uçucu Yağı.....	13
2.3. Nanoemülsiyonlar.....	16
2.3.1. Nanoemülsiyonların Avantajları.....	17
2.3.2. Nanoemülsiyonların Dezavantajları ve Sınırlılıkları.....	17
2.3.3. Nanoemülsiyon Bileşimi.....	18
2.3.4. Nanoemülsiyonların Hazırlama Yöntemleri.....	18
2.3.5. Nanoemülsiyon Stabilesini Etkileyen Faktörler.....	19

2.3.6. Nanoemülsiyonların Karakterizasyon Yöntemleri.....	21
2.3.7. Nanoemülsiyonların Kozmetikte Uygulama Alanları.....	21
2.4. Nanoemüljel Tanımı.....	22
2.4.1 Nanoemüljelin Avantajları.....	24
2.4.2 Nanoemüljelin Sınırlılıkları.....	24
2.4.3.Nanoemüljellerin Hazırlanması.....	25
2.4.4. Nanoemüljelin Karakterizasyonu.....	26
2.4.4.1. Zeta Potansiyeli.....	26
2.4.4.2. Damlacık Boyutu Ölçümü ve Polidispersite İndeksi (PDI).....	27
2.4.4.3.Reolojik Karakterizasyon.....	27
2.4.4.4.Doku Profili Analizi.....	28
2.4.5.Nanoemüljellerin Kozmetikte Uygulama Alanları.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Gereç.....	31
3.1.1 Kullanılan Alet ve Malzemeler.....	31
3.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
3.2.Yöntemler.....	32
3.2.1 Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Tasarlanması	32
3.2.1.1 Y/S Tipi Nanoemülsiyon Bileşenlerin Seçimi.....	32
3.2.1.2 Y/S Tipi Nanoemülsiyon Formülasyonların Hazırlanması.....	33
3.2.2. Nanoemülsiyon Formülasyonları Üzerinde Yürütülen Çalışmalar	35
3.2.2.1. Nanoemülsiyon Santrifüj Testi.....	35
3.2.2.2. Nanoemülsiyon Termal Stabilitate Testi	35
3.2.2.3. Nanoemülsiyon Damlacık Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Polidispersite İndeksi Ölçümleri.....	36

3.2.3. Nanoemüljel Formülasyonlarının Hazırlanması.....	36
3.2.4. Nanoemüljel Formülasyonları Üzerinde Yürütülen Çalışmalar	36
3.2.4.1. Nanoemüljel Santrifüj Test.....	36
3.2.4.2. Nanoemüljel Termal Stabilite Testi.....	37
3.2.4.3. Nanoemüljellerin Fizikokimyasal Stabilite Çalışmaları.....	37
3.2.4.3.1. Nanoemüljel pH ve İletkenlik Ölçümleri.....	37
3.2.4.3.2 Nanoemüljel Vizkozite Ölçümleri.....	37
3.2.4.3.3 Nanoemüljel Damlacık Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Polidispersite İndeksi Ölçümleri.....	38
3.2.4.3.4. Nanoemüljel Doku Profili Analizi (TPA).....	38
3.3. In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları.....	38
3.3.1.Vero Hücre Kültürü ve HSV-1.....	39
3.3.2.Çalışılacak Madde.....	39
3.3.3. Konsantrasyon Doz Çalışmaları.....	39
3.3.4 T ve P Bileşenlerinin Vero Hücre Kültürü Üzerine Etkilerinin Mikroskop Altında Değerlendirilmesi ve Hücre Canlılığı Üzerine Etki Eden Dozun Yorumlanması	39
3.5.CCK-8 Reaktifini Kullanılarak Vero Hücre Kültürü Üzerinde Gerçekleşen Toksik Etkilerin Tespit Edilmesi.....	40
3.3.6. Antiviral Aktivite Çalışmaları.....	41
3.3.7. Formülasyonların HSV-1 Üzerinde ki Antiviral Aktivitesi.....	41
4. BULGULAR.....	44
4.1. Nanoemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	44
4.1.1. Nanoemülsiyon Santifüj Testine Ait Bulgular.....	44
4.1.2. Nanoemülsiyon Termal Teste Ait Bulgular	45
4.2. F1P2 kodlu Nanoemüljelin Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	46
4.2.1. F1P2 Kodlu Nanoemüljelin Santifüj Testine Ait Bulgular.....	46

4.2.2.F1P2 Kodlu Nanoemüljin Termal Stabilite Testine Ait Bulgular.....	47
4.3.F3P1 kodlu Nanoemüljin Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	48
4.3.1.F3P1 kodlu Nanoemüljin Santifüj Testine Ait Bulgular.....	48
4.3.2.F3P1 Kodlu Nanoemüljin Termal Stabilite Testine Ait Bulgular.....	49
4.4. Doku Profil Analizine (TPA) Ait Sonuçları.....	49
4.5. Nanoemüljellerin pH Ölçümüne Ait Bulgular.....	50
4.6. Nanoemüljellerin İletkenlik Ölçümlerine Ait Bulgular.....	50
4.7. Nanoemüljellerin Vizkozite Ölçümlerine Ait Bulgular.....	51
4.8. Fizikokimyasal Stabilite Testinde Damlacık Boyutu, PDI, Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular.....	56
4.8.1. Nanoemüljel Ortalama Damlacık Boyutu 3 Aylık Ölçüm Sonuçları.....	56
4.8.2. Nanoemüljel 3 Aylık Polidispersite İndeksleri (PDI) Bulguları	57
4.8.3. Nanoemüljel 3 aylık Zeta Potansiyeli (mV) bulguları.....	57
4.9. In Vitro Hücre Kültürüne Ait Bulgular.....	58
4.9.1.T ve P Bileşenlerinin Vero Hücre Kültürü Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular.....	58
4.9.2. CCK Test Verilerine Ait Bulgular.....	60
4.9.3. Formülasyonların HSV-1 Üzerinde ki Antiviral Aktivitesine Ait Bulgular.....	63
5. TARTIŞMA.....	66
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ.....	86
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	<u>87</u>

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Geleneksel emüljel ile nano-emüljel arasındaki karşılaştırma.....	23
Tablo 2-2: Piyasada bulunan emüljel ürün örnekleri ve görselleri.....	29
Tablo 3-1: Kullanılan Alet ve Malzemeler.....	31
Tablo 3-2: Kullanılan Kimyasallar.....	32
Tablo 3-3: Yağ fazı %5 ve Yağ fazı:Smix = 1:3 olan F1 formülasyonunun bileşimi ve ultrasonikasyon süreleri.....	34
Tablo 3-4: Yağ fazı %7,5 ve Yağ fazı:Smix = 1:2 olan F2 formülasyonunun bileşimi ve ultrasonikasyon süreleri.....	34
Tablo 3-5: Yağ fazı %10 ve Yağ fazı:Smix = 1:1,5 olan F3 formülasyonunun bileşimi ve ultrasonikasyon süreleri	35
Tablo 4-1: Nanoemülsiyon formülasyon çalışmalarına ait karakterizasyon verileri	44
Tablo 4-2: Nanoemülsiyon santrifüj testi ölçüm sonuçları.....	44
Tablo 4-3: Nanoemülsiyon termal stabilite testi ölçüm sonuçları.....	44
Tablo 4-4: Uzun süreli stabilite çalışmaları için seçilen formülasyon bileşenlerine ait tablo.....	45
Tablo 4-5: Nanoemülsiyon formülasyon çalışmalarına ait karakterizasyon verileri.....	46
Tablo 4-6: F1P2 kodlu nanoemüljelin santifüj testine ait ölçüm sonuçları.....	47
Tablo 4-7: F1P2 kodlu nanoemüljelin termal stabilite testine ait ölçüm sonuçları.....	47
Tablo 4-8: F3P1 kodlu nanoemüljele ait karakterizasyon verileri	48
Tablo 4-9: F3P1 kodlu nanoemüljelin santifüj testine ait ölçüm sonuçları.....	48
Tablo 4-10: F3P1 kodlu nanoemüljelin termal stabilite testine ait ölçüm sonuçları	49
Tablo 4-11: Doku Profil Analizi (TPA) sonuçları	49
Tablo 4-12: Nanoemüljellerin pH ölçümlerine ait bulgular.....	50
Tablo 4-13: Nanoemüljellerin iletkenlik ölçümlerine ait bulgular.....	50
Tablo 4-14: F1P2 %1 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular.....	51
Tablo 4-15: F1P2 %1,5 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular	52
Tablo 4-16: F3P1 %1 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular.....	53
Tablo 4-17: F3P1 %1,5 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular	54
Tablo 4-18: Nanoemüljellerin 1. gün damlacık boyutu, PDI, zeta potansiyeli ölçümlerine ait bulgular (n=3).....	55
Tablo 4-19: Nanoemüljellerin 3 aylık Ortalama Damlacık Çapı (nm) bulguları (n=3)	55
Tablo 4-20: Nanoemüljellerin 3 aylık PDI bulguları (n=3).....	56
Tablo 4-21: Nanoemüljellerin 3 aylık Zeta Potansiyeli (mV) bulguları (n=3).....	56
Tablo 4-22: CCK-8 Test verileri ve inhibisyon konsantrasyon (IC) oranları.....	60

Tablo 4-23: Antiviral çalışma için gerçekleştirilen virus titrasyon test sonuçları ve hesaplanan doku infektif doz 50 (DKID₅₀) değerleri.....	63
---	-----------



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Deri Sisteminin Bileşenleri.....	4
Şekil 2-2:Epidermisin Katmanları.....	5
Şekil 2-3: Melisa (<i>Melissa officinalis</i>).....	12
Şekil 2-4: Yıldız Anason (<i>Illicium verum</i>).....	14
Şekil 2-5: Su içinde yağ ve yağ içinde su emülsiyonları.....	16
Şekil 2-6: Nanoemulgel üretim aşamaları.....	26
Şekil 2-7: Uçucu yağlar için nanosistem platformlarının şematik gösterimi.....	30
Şekil 3-1: Pleyt çalışma planı örneği.....	41
Şekil 3-2: 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti çalışma planı.....	43
Şekil 4-1: Tmax ve Tmin formülasyonu. Farklı dilüsyonların Vero hücre hattı üzerindeki etkilerinin 48 saat mikroskop görüntüleri	58
Şekil 4-2: Placebo ve Farklı dilüsyonların Vero hücre hattı üzerindeki etkilerinin 48 saat mikroskop görüntüleri	59
Şekil 4-3: Tmax formülasyonu için regresyon eğrileri.....	60
Şekil 4-4: Tmin formülasyonu için regresyon eğrileri.....	61
Şekil 4-5: P bileşeni için regresyon eğrileri.....	61
Şekil 4-6: Formülasyonların herhangi bir bileşen ile muamele edilmeyen HSV-1 grubu ile kıyaslamalı antiviral aktivitesi logaritmik ölçek grafiği (Log 10).....	63
Şekil 4-7: Tmax 10 ⁻⁴ son sulandırma gözünde görülen plak ve CPE alanları(x160).....	63
Şekil 4-8: Bileşen ile muamele edilmeyen ve Placebo(P) kullanılan HSV-1'in titrasyon testinde CPE gösteren son sulandırma katsayısı görüntüsü (x160).....	64

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

HSV: Herpes simpleks virüs

Y/S: Su İçinde Yağ

S/Y: Yağ İçinde Su

PDI: Polidispersite İndeks

Smix: Yüzey etkin madde karışımı

NE : Nanoemülsiyon

$\bar{x}$: 1: Değerlerin ortalaması

σ : Standart sapma

CPE: Sitopatik etki

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

HÜV: Hücre üretme vasatı

OD: Optik yoğunluk

IC: İnhibisyon konsantrasyonu

DKID50: Doku kültürü enfektif dozu 50

IC50: İnhibitör konsantrasyon 50

CC50: Sitotoksik konsantrasyon 50

IS: Selective index

ÖZET

Herpes simpleks virüsü (HSV) enfeksiyonları dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. İnsanlardaki en yaygın enfeksiyonlardan biri olup, genel popülasyonun > %70'ini enfekte ettiği bildirilmiştir. Herpes labialis enfeksiyonunun topikal tedavisi standarttır, çoğunlukla sadece DNA polimerazlarını inhibe eden asiklovir ve türevleridir. Son zamanlarda antiherpetik ilaçlara karşı direnç bildirilmiştir. Bu nedenle, HSV enfeksiyonlarıyla başa çıkmak için yeni antiviral ajanlara ihtiyaç vardır.

Nanoemülsiyonlar ilaç moleküllerinin taşıyıcıları olarak görev yapan mikron altı boyut aralığındaki kolloidal parçacıklı sistemlerdir. Nanoemüljel, seçilen ilacı cilde iletmek amacıyla bir araç olarak kullanılan emülsiyonun hem S/Y hem de Y/S tipi olabileceği bir jel ve emülsiyon kombinasyonudur.

Bu tez çalışmasının temel amacı uçuk üzerinde etkili bitkisel kaynaklı antiviralleri içeren topikal nanoemüljel formülasyonlarının geliştirilmesidir.

Formülasyonlar ilk olarak ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak nanoemülsiyon formda hazırlanmış olup stabilite testlerine maruz bırakılmıştır. İkinci aşamada doğal bir polimer olan ksantam zankı (1:1, 1:1,5, 1:2) ile karıştırılarak nanoemüljel forma dönüştürülmüş ve ardından tekrar hızlandırılmış stabilite testlerine bakılmıştır. Stabilite testlerini başarı ile geçen F1P2 %1, F1P2 %1,5, F3P1 %1, F3P1 %1,5 kodlu formülasyonlar 3 aylık fizikokimyasal stabilite testlerine tabi tutulmuştur. Tüm testler değerlendirildiğinde stabil olan ve en uygun sonucu veren F1P2 1%'lik formülasyon antiviral etkinlik testleri için seçilmiştir.

Çalışmada test edilen madde dilüsyonlarının (T_{max} , T_{min} ve P) hücreler üzerinde öldürücü [Letal doz (LD)] olduğu görülen aralık değerleri hepsinde $1/500 \geq LD(n) > 1/1500$ olarak belirlenmiştir. Yapılan analiz hesaplamaları ve mikroskop altındaki değerlendirmeler sonucunda antiviral çalışma konsantrasyonunun 1/2000 dilüsyonunda olmasına karar verilmiştir. 1/2000 dilüsyon oranlarında $T_{max} = \%94,37$, $T_{min} = \%82,21$ oranlarında olacak şekilde antiviral etkinlik görülmüştür. Yaptığımız çalışmada antiviral etkinliği gösteren miktar 1/2000 dir ve IC_{50} değerinden daha fazla antiviral etkinlik sergilemektedir.

Anahtar Kelimeler: HSV-1, nanoemüljel, melisa uçucu yağı, yıldız anason uçucu yağı, antiviral aktivite



ABSTRACT

Herpes simplex virus (HSV) infections constitute one of the most important health problems worldwide. It is one of the most common infections in humans and has been reported to infect >70% of the general population. Topical treatment of herpes labialis infection is standard, mostly acyclovir and its derivatives, which inhibit only DNA polymerases. Recently, resistance to antiherpetic drugs has been reported. Therefore, new antiviral agents are needed to deal with HSV infections.

Nanoemulsions are systems with colloidal particles in the submicron size range that serve as carriers of drug molecules. Nanoemulgel is a combination of gel and emulsion where the emulsion used as a vehicle to deliver the selected drug to the skin can be both W/O and O/W type.

The main purpose of this thesis is to develop topical nanoemulgel formulations containing herbal antivirals effective on herpes.

The formulations were first prepared in nanoemulsion form using the ultrasonication method and were subjected to stability tests. In the second stage, it was converted into nanoemulgel form by mixing it with xantham gum, a natural polymer (1:1, 1:1.5, 1:2), and then accelerated stability tests were performed again. The formulations coded F1P2 1%, F1P2 1.5%, F3P1 1%, F3P1 1.5%, which successfully passed the stability tests, were subjected to 3-month physicochemical stability tests. When all tests were evaluated, the F1P2 1% formulation, which was stable and gave the most appropriate results, was selected for antiviral efficacy tests.

The range values of the substance dilutions (T_{max} , T_{min} and P) tested in the study, which were seen to be lethal [Lethal dose (LD)] on the cells, were all determined as $1/500 \geq LD(n) > 1/1500$. As a result of the analysis calculations and evaluations under the microscope, it was decided that the antiviral working concentration should be at a dilution of 1/2000. Antiviral activity was observed at 1/2000 dilution rates, with $T_{max} = 94.37\%$ and $T_{min} = 82.21\%$. In our study, the amount showing antiviral activity is 1/2000 and it exhibits more antiviral activity than the IC_{50} value.

Keywords: HSV-1, nanoemulgel, lemon balm essential oil, star anise essential oil, antiviral activity



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonları dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir (van de Sand, L ve ark. 2021). HSV'ler, yaşam boyu kalıcı enfeksiyonlar oluşturabilen ve soğuk yaralardan mononükleoza, doğum kusurlarından kanserlere kadar çeşitli hastalıklarla ilişkili olan vücudun tüm bölgelerinde bulunabilen patojenlerdir (Zhang ve ark. 2019).

HSV-1 neredeyse evrenseldir ve genellikle erken çocukluk döneminde aile ile yakın temastan edinilir. İnsanlardaki en yaygın enfeksiyonlardan biri olup, genel popülasyonun > %70'ini enfekte ettiği bildirilmiştir (Pourchet ve ark., 2017). HSV-1, insanlarda akut enfeksiyondan, kronik hastalıklara ve asemptomatik enfeksiyondan hayatı tehdit eden ciddi hastalıklara kadar değişebilen klinik tablolara neden olabilmektedir. Enfeksiyon, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda, ciddi ve progresif seyretmekte olup morbidite ve mortaliteye yol açmaktadır (Zhang ve ark. 2019).

Herpes labialis enfeksiyonunun topikal tedavisi standarttır, çoğunlukla sadece DNA polimerazlarını inhibe eden asiklovir ve türevlerini, gansikloviri, foskarneti ve sidofoviri içerir. Asiklovir, gansiklovir ve sidofovir, DNA zincir sonlandırıcıları olarak işlev gören ve sonuçta viral DNA'nın uzamasını önleyen nükleozid analoglarıdır (Zhang ve ark. 2019).

Bitkiler insanlık tarihi boyunca tıbbi tedavide kullanılmış olup, günümüzde de bitkisel tedaviye olan ilgi ülkemizde ve tüm dünyada artmıştır. Günümüzde geliştirilen antiviral ilaçların etkileri sınırlıdır. Doğada mevcut bulunan bitki bileşenlerinin sayısal çokluğu ve yapısal çeşitliliği göz önüne alındığında yeni antiviral tedaviler için umut verici kaynaklar olarak kabul edilmektedir. Bitkilerden elde edilen bazı bileşiklerin özellikle flavonoidlerin antiviral etkili oldukları gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2019).

Farmasötik endüstrisi, özellikle uygun alternatif antiviral ajanlara odaklanarak, öncü bileşikleri belirlemek amacıyla giderek artan bir şekilde tıbbi bitkileri hedeflemektedir. Fitokimyasalların antiviral etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarda, birden çok ilaç taşıyıcı sistemin kullanıldığı görülmektedir. Antiviral tıbbi bitkiler insan sağlığını tehdit eden ciddi salgınlara sebebiyet veren birçok virüsle mücadelede, farklı etki mekanizmaları ile antiviral aktivite göstermektedir. Yapılan araştırmalarda bitki

fitokimyasallarının viral enfeksiyonların gerek direkt tedavi sürecinde yer aldığı gerekse destek tedavisinde rol aldıkları görülmüştür (Demir ve Akpınar. 2021).

Uçucu yağlar ve bileşenlerinin çok çeşitli mikroorganizmalara karşı aktif olduğu bilinmektedir. Uçucu yağlarda bulunan fenilpropanoidler ve seskiterpenler, antiviral aktivitelerine katkıda bulunur. Hastalarda antiviral tedavi için yüksek seçicilik indeksine sahip ilaçlar tercih edilir. Bu nedenle tekrarlayan herpes enfeksiyonunun tedavisinde kompleks bir karışım olarak yıldız anason yağı ve tek bileşen olarak β -karyofilleninin topikal terapötik ajanlar olarak uygulanabileceği bildirilmektedir. Hem yıldız anason esansiyel yağının hem de bu bitkiden izole edilen tüm bileşiklerin, viral süspansiyon deneylerinde serbest virüs partiküllerinin doğrudan inaktivasyonu yoluyla anti-HSV-1 aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. Melisa, uçuk virüs ailesindeki virüslerle savaşmada etkili olduğu için genellikle uçuk tedavisinde tercih edilen bir bitkidir. Yaygın olarak kullanılan antiviral ajanlara karşı direnç geliştiren kişiler için özellikle yararlı olabilecek viral enfeksiyonların yayılmasını engellemek için kullanılabilir. Melisa bitki ekstraktları gibi uçucu yağının da HSV üzerinde etkinliğini gösteren çalışmalar literatürde yer almaktadır. Phytomedicine'de yayınlanan 2008 tarihli bir araştırmada, yüksek konsantrasyonlarda melisa uçucu yağının, bir plak azaltma tahlili kullanılarak maymun böbrek hücreleri üzerinde test edildiğinde, herpes simpleks virüsü tip 1 ve 2'yi neredeyse tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, melisa uçucu yağının antiviral etkileri olduğu ve lipofilik yapısı nedeniyle cilde nüfuz edebildiği için uçuktan kurtulmak için uygun bir topikal tedavi işlevi gördüğünü belirtmiştir (Astani ve ark. 2014).

Nanoemülsiyonlar (NE'ler), mikron altı aralığında damlacık oluşumu nedeniyle ultra ince emülsiyonlar, miniemülsiyonlar ve mikron altı emülsiyonlar olarak da adlandırılabilir. Damlacık boyutu 20 ila 500 nm arasında değişebilen NE'ler küçük boyutları ile aktif bileşenlerin cilde etkili bir şekilde iletilmesini sağlarken, kremalaşma, sedimentasyon ve agregasyona karşı doğal bir stabilite sağlarlar (Guglielmini. 2008)

NE'ler, kozmetiklerin kontrollü dağıtımı ve aktif bileşenlerin belirli cilt katmanlarında optimize edilmiş dağılımı için potansiyel araçlar olarak kişisel bakım ürünlerinde uygulama için son yıllarda büyük ilgi görmektedir (Baser 2009). Geleneksel dağıtım sistemlerine kıyasla NE'ler, bitkisel ilaçların artan yüklemesi, üretiminin basitliği, iyileştirilmiş terapötik etkinliği ve stabilitesine yönelik ilgiyi de çekmiştir

(Harwansh ve ark. 2019). Topikal ilaç dağıtımı için ortaya çıkan bir teknik olan nanoemüljel, şu anda egzama, Herpes simpleks, akne vb. dahil olmak üzere viral, bakteriyel ve mantar enfeksiyonlarından kaynaklanan çeşitli cilt bozukluklarının tedavisinde araştırılmaktadır (Alexander ve ark., 2013). Nanoemüljel yaklaşımı ise nanoemülsiyon sisteminin bir hidrojel matrisine dahil edilmesiyle hazırlanan nanoemülsiyon bazlı hidrojin geliştirilmesine dayanır. Nanoemüljel sisteminin yüksek çözünürlük ve daha iyi yapışma özellikleri, cilt boyunca daha büyük konsantrasyon gradyanına yol açarak daha iyi cilt penetrasyonu sağlar (Gannu ve ark., 2010). Nanoemüljel sisteminin daha da geliştirilmiş tiksotropik özellikleri, yağsız, leke bırakmayan, yumuşatıcı, iyi yayılabilir, çıkarılması kolay ve hoş görünümlü olması kabul edilebilirliğini desteklemektedir (Eid ve ark. 2014).

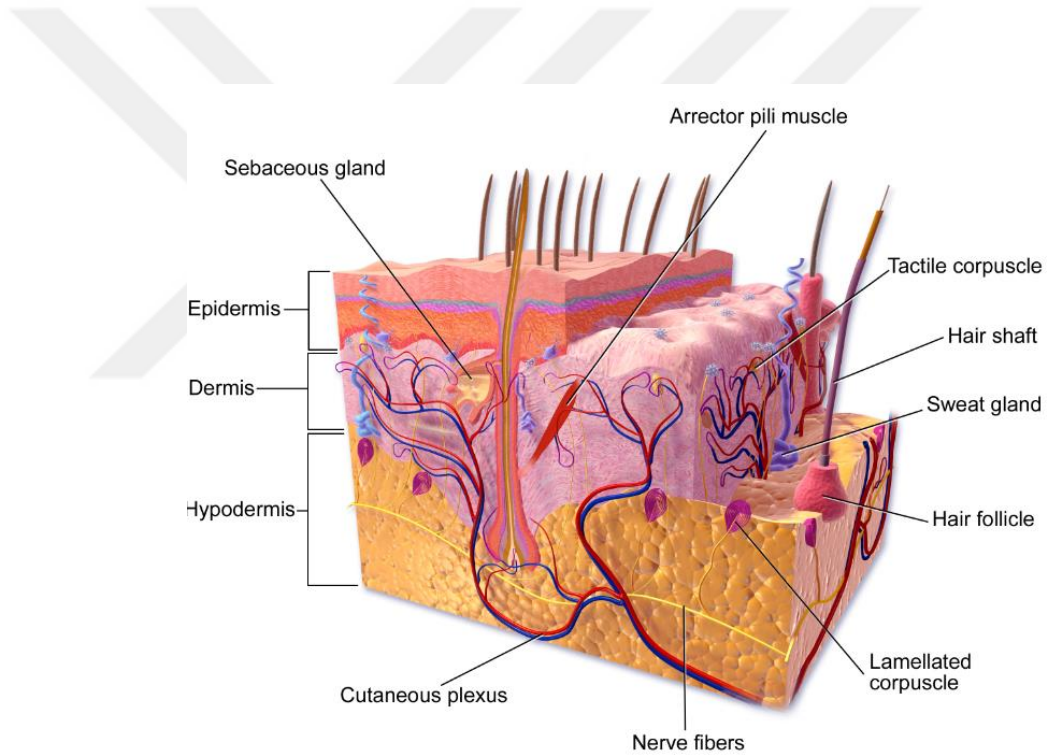
Yukarıdaki bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında, HSV-1 üzerinde topikal uygulamaya yönelik Anason (*Illicium verum*) ve Melisa (*Melisa Officinalis*) uçucu yağlarını içeren nanoemüljel formülasyonlarının geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Derinin Yapısı ve Özellikleri

Deri, vücudun organ sistemlerinin en büyüğüdür. İnsanlarda, bu biyolojik sistem toplam vücut ağırlığının yaklaşık %12 ila %15'ini oluşturur ve 1,5 - 2 metrekarelik bir alanıdır. Amacı vücudu ultraviyole (UV) ışınlarından, hasardan, mikrobiyal saldırıdan ve ayrıca dehidrasyondan korumadır.

Deri; epidermis, dermis ve hipodermis (deri altı doku) olmak üzere 3 temel kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2-1: Deri sisteminin bileşenleri

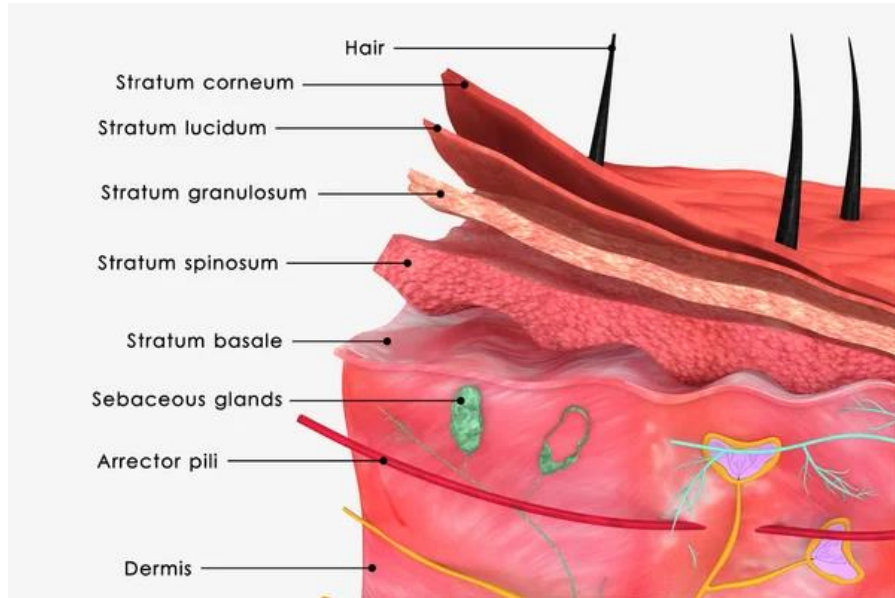
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0810_SkinAnatomy_01.png)

Epidermis (Üst Katman) : Epidermis yaklaşık 0,1 - 0,3 mm kalınlığında olup %95'i keratinositler olan birçok hücreden oluşmaktadır. Derimizin dıştan görünen tabakasıdır.

Epiderminin, cilt nemini koruma, yeni cilt hücrelerinin üretilmesi, vücudu koruma ve cilde rengini verme gibi birçok işlevi vardır.

Epiderminin en dış tabakası (stratum corneum) suyu tutar ve cildimizi nemli ve sağlıklı tutarak hidrasyonu sağlar. Aynı zamanda vücudunuzu UV radyasyon, patojenler (bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler) ve kimyasallar dahil olmak üzere pek çok zarardan korumak için bir zırh gibi davranır. Yeni cilt hücreleri, epiderminin alt katmanında (stratum bazale) gelişir ve yaşlandıkça diğer katmanlara doğru ilerler. Epidermis, cilt rengini sağlayan bir grup pigment olan melanin yapan melanosit adı verilen hücrelere sahiptir (my.clevelandclinic.org. erişim tarihi 17. 07.2023).

Epidermis dıştan içe doğru stratum corneum, stratum lucidum, stratum granulosum, stratum spinosum ve stratum basale olmak üzere 5 tabakadan oluşmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2-2: Epiderminin katmanları (<https://tr.depositphotos.com/63100959/stock-photo-skin.html> <https://www.abilenederma.com/skin-layers>)

Stratum Corneum (Boynuzsu Tabaka): Epiderminin en dış tabakası stratum korneumdur. Stratum korneum, vücudun güneşten kaynaklanan çevresel hasara, yabancı maddelerin girmesine, toksinlere ve mikroorganizmalara karşı ilk savunmasıdır. Bu tabaka cilt sağlığında karmaşık ve kritik bir rol oynar.

Stratum korneum, korneositler olarak adlandırılan ölü hücrelerden (keratinositler) oluşur. Teknik olarak protein zarfı ve lipidlerle çevrili 15-20 kat ölü düzleştirilmiş hücredir. Korneositleri bir arada tutan bağlara, derinin geçirimsizliğini oluşturan korneodesmozomlar denir. Korneodesmozomlar bozulduğunda bu korneositlerin pul pul dökülmesine neden olur.

Stratum Lucidum: Stratum lucidum, yalnızca ayak tabanlarında ve avuç içi gibi kalın deride oluşur. Stratum lucidum, cilt ve vücut için birkaç tür koruma sunar. Kalınlığı, özellikle avuç içi ve ayak tabanı gibi bölgelerde sürtünmenin etkilerini azaltır. Bu katman aynı zamanda cildi su geçirmez yapmak için stratum granulosum ile birlikte çalışır.

Stratum Granulosum: Bildiğimiz gibi epidermis beş tabakadan oluşur ve stratum granulosum bu tabakaların tam ortasında yer alır. Sadece 3-5 hücre katmanından oluşan çok ince bir katmandır. Hücrelerin üst göç için hazırlandığı ince bir tabakadır. Bu katmanda hücreler organellerini ve çekirdeklerini kaybederler (başka bir deyişle ölürler) ve cildin bariyer işlevine katkıda bulunan "lipid zarfı" adı verilen bir zarfı alırlar.

Keratinositler, stratum granulosuma ulaştıklarında 'granüler hücreler' olarak bilinmeye başlarlar. Bu hücreler, keratinin çapraz bağlanmasını ve hücrenin hidrasyonunu destekleyen protein yapıları olan keratohyalin granüllerini içerir.

Filagrin adı verilen bir protein, stratum granulosum'un hücreleri tarafından üretilir. Filagrin'in cildin dış tabakasının yapısında önemli bir rol oynadığı ve ayrıca nemi tutmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir.

Stratum Spinosum (Malpighi): Stratum bazale'nin hemen üzerinde yer alan 8-10 hücre tabakası kalınlığında olan en büyük tabakadır. Bu katman, cildi destekleyen birbirine kenetlenmiş hücrelerden oluşur. Stratum spinosum, görünümü nedeniyle bazen "dikenli" veya "dikenli hücreli" katman olarak da adlandırılır.

Bu alt tabakadaki keratinositler düzensiz şekillidir ve hücreler arasında güçlü yapışma sağlayan protein kompleksleri olan dezmozomlarla birleştirilir. Dezmozomlar derinin yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynar.

Stratum spinosum'un ana işlevi, yabancı maddelere karşı koruma sağlamak ve nem üretilip tutmaktır. Langerhans hücreleri, keratinositler arasında dağılmış olarak stratum spinosumda bol miktarda bulunur. Patojenik mikroorganizmalara ve hasarlı hücrelere karşı koruma sağlayan birinci basamak savunucuları olarak hareket ederler. Stratum bazale'de yeni keratinositler oluştuğunda, stratum spinosum'a doğru hareket ederler. Bu noktada keratinositler poligon şeklini alır ve keratin üretmeye başlar. Stratum spinosum, cildimizin esnek ve güçlü olmasına yardımcı olur.

Stratum Bazale (Germinatif Bazal Tabaka): Epidermal tabakaların en altında stratum bazale veya stratum germinativum bulunur. Bu katmanda yeni cilt hücreleri gelişir ve ayrıca keratin proteini üreten keratinosit kök hücrelerini içerir. Bu, cilt hücrelerinin bölündüğü epidermisin alanıdır. Yeni hücreler oluştuğunda, eski hücreler cilt yüzeyine doğru itilir.

Epidermise doğrudan kan akışı yoktur, bu nedenle cilt hücrelerini besleyen tüm besinler dermisten gelir. Sadece bazal tabakadaki hücreler beslenir, hücreler bu tabakadan yukarı doğru uzaklaştıkça ölmeye başlarlar. Hücreler cilt yüzeyine ulaştıklarında, deskuamasyon adı verilen bir süreçte pulcuklar halinde dökülürler.

Dermis

Dermis, epidermis ile derinin en derin tabakası arasında konumlanan derinin ana kısmıdır. Dermis büyük ölçüde liflidir ve boyutu vücutta değişiklik gösterse de epidermisten önemli ölçüde daha kalındır. Kan damarlarının, lenf damarlarının, duyu sinir uçlarının, ter bezlerinin ve kanallarının, kılların ve kasların ve sebum üreten yağ bezlerinin önemli yapılarını barındıran sert, elastik bir tabakadır. Dermiste epidermise göre daha az hücre vardır ve bu hücreler bir zarla çevrilidir. Dermisi esnek yapan elastik lifler de vardır. Dermiste fibroblast adı verilen özelleşmiş hücreler vardır. Bu hücreler, özellikle yaraların iyileşmesinde önemli olan kolajeni üretirler. Dermisteki küçük kan damarları, epidermal hücrelere besin gereksinimlerini sağlar ve burada da cildi dokunma, ağrı, ısı ve soğuğu hissetme yeteneğine sahip bir duyu organına dönüştüren sinirler bulunur. Aynı zamanda vücut ısını düzenlemek ve cilde besin sağlamakta dermisin ana işlevleri arasındadır.

Hipodermis

Hipodermis (deri altı tabakası), derinin en derin tabakasıdır. Bu tabaka kolajen demetleri içerir ve esas olarak adipositlerden (yağ hücreleri) oluşur.

Hipodermisin ana işlevleri aşağıdaki gibidir.

Hipodermisin yağ depolamak ve vücut ısını kontrol etmek gibi önemli görevlerinin yanısıra dermisi kaslara ve kemiklere bağlayan bağ dokusuna da sahiptir. Dermisteki kan damarları ve sinirler de vücudun geri kalanına bağlandıkları hipodermiste büyümeye başlar.

2.2. Herpes simpleks virüs (HSV)

Herpes simpleks virüsü (HSV) enfeksiyonları dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. Bu insan patojeni DNA virüsleri, Alphaherpesvirinae ailesine aittir. Yaşam boyu kalıcı enfeksiyonlar oluşturan ve soğuk yaralardan, mononükleoza, doğum kusurlarında kanserlere kadar çeşitli hastalıklarla ilişkili olabilen ve her yerde bulunan patojenlerdir. Bugüne kadar alfa, beta ve gama olmak üzere üç alt aileye ait sekiz insan herpes virüsü keşfedilmiştir.

Alfa-herpes virüsler; Herpes simplex 1 (HSV-1), Herpes simplex 2 (HSV-2) ve suçiçeği-zoster virüsünden (VZV) oluşur,

Beta-herpes virüsler; insan sitomegalovirüsü (HCMV), insan herpes virüsü 6 (HHV 6) ve insan herpes virüsünden 7 (HHV-7) oluşur,

Gama-herpes virüsler; epstein-barr virüsü (EBV) ve Kaposi sarkomu ile ilişkili herpes virüsünden (KSHV) oluşur (İnce Köse ve Özkan 2022; Zhang ve ark. 2019).

HSV sinir sisteminde latent kalıcı bir enfeksiyon oluşturup epitelyal ve nöronal hücreleri enfekte etme yeteneğine sahiptir (Otth ve ark., 2016).

Gelişmekte olan dünyada, HSV-1 neredeyse evrenseldir. İnsanlardaki en yaygın enfeksiyonlardan biri olup, genel popülasyonun > %70'ini enfekte ettiği bildirilmiştir. (Pourchet ve ark., 2017).

İnsanları enfekte edebilen sekiz herpes virüsünün üzerinde, HSV-1 muhtemelen orofasiyal bölgede en sık görülen patojendir. Birincil HSV-1 enfeksiyonu, enfekte vücut sıvıları veya aktif lezyonlarla doğrudan temas yoluyla elde edilir; bundan sonra, HSV-1 yaygın olarak trigeminal gangliondaki latent enfeksiyonu belirler ve reaktivasyon

meydana gelebilir ve kutanöz ve mukokutanöz tekrarlayan herpetik belirtilere neden olabilir. Oral HSV-1 enfeksiyonu ayrıca herpetik özofajit, herpetik pnömoni, eritema multiforme ve muhtemelen periodontal hastalıklar gibi çeşitli komplikasyonlara yol açabilir (Arduino ve ark., 2016)

HSV enfeksiyonu tipik olarak çocukluk döneminde, orolabial veya nazal sekresyonlardan enfekte damlacıkların duyarlı mukozal yüzeylere veya aşınmış deriye doğrudan inokülasyonu ile ortaya çıkar ve enfeksiyonlar çoğunlukla asemptomatiktir ve birincil enfeksiyonların yalnızca %1-6'sı klinik olarak tanınır. İlk enfeksiyon tipik olarak dudakta meydana gelir, ancak gözlerin veya burnun mukoza zarlarında da olabilir (Otth ve ark., 2016). HSV-1, 6-14 yaş arası çocuklarda %31, 14-49 yaş arası kişilerde %49 ve 65 yaş üstü popülasyonda %80-90 prevalansı olan dünya çapında bir enfeksiyondur. Bununla birlikte, enfekte olmuş kişilerin sadece %20-40'ında semptom gelişir. Buna rağmen yazarlar, asemptomatik deneklerin yaklaşık %35'inin göz ve ağız sürüntülerinde HSV'nin pozitif olduğunu ve tükürükte gözyaşından daha yüksek HSV-1 genom kopya sayılarının görüldüğünü bildirmiştir. Sağlıklı insanlar, herpes virüslerinin rezervuarlarıdır ve asemptomatik saçılma, HSV-1'in yayılmasında önemli bir faktördür (Otth ve ark., 2016).

2.2.1. Klasik Tedavi Yöntemleri

Klinik çalışmalarda çok sayıda aşı adayı araştırılmış olmasına rağmen, HSV enfeksiyonlarının önlenmesi için ruhsatlı bir aşı mevcut değildir. Son yıllarda, akut HSV enfeksiyonlarının tedavisi için viral DNA-polimerazını hedef alan birçok farklı antiviral ilaç onaylanmıştır. HSV'ye karşı en yaygın kullanılan antiviral ajanlar asiklovir (ACV), valasiklovir, famsiklovir, cidofovir ve foscarnet'tir. ACV ve ilgili nükleosid analogları, viral replikasyonu başarıyla inhibe edebilir ve böylece HSV ile ilişkili semptomların iyileşmesine aracılık edebilir, ancak ACV'ye karşı ilaç direncinin ortaya çıkması, HSV enfeksiyonlarının tedavisi için bir engel oluşturmuştur (Jiang ve ark. 2016; van de Sand, L). Viral HSV timidin kinazını (TK) hedefleyen diğer nükleosid analoglarına karşı çapraz direnç sıklıdır, çünkü HSV'nin ACV'ye duyarlılığındaki azalma çoğunlukla TK genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Bununla birlikte, direnç sadece HSV-TK'yi hedefleyen famsiklovir veya pensiklovir gibi ilaçlara karşı değil, aynı zamanda viral DNA-polimeraz

inhibitörleri foscarnet ve sidofovir'e karşı da ortaya çıkar, ikincisi kök hücre transplantasyonu yapılan hastalarda ciddi şekilde görülür (van de Sand ve ark., 2021).

Bu ilaçların etki mekanizması temel olarak virüse özgü enzim, TK ve DNA polimerazı inhibe etme yeteneklerine bağlıdır. Bu antiviral ajanlardan bazıları toksik yan etkiler üretebilir ve yaygın olarak kullanılan anti-herpesvirüs ilaçlarına dirençli virüs suşlarının ortaya çıkışı, özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalarda büyüyen bir sorundur (Allahverdiyev ve ark., 2004 Crumpacker ve ark., 1982). Nispeten daha az sitotoksik bir ilaç olan asiklovir, herpes virüsü enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan en çok tercih edilen ve güçlü bir ilaçtır. Ancak son yıllarda, asiklovir ve diğer ilaçların genital herpes enfeksiyonlarını tedavi etmede etkisiz olduğu rapor edilmiştir. HSV-2'nin de bu ilaçlara direnç kazandığı bildirilmiştir (Allahverdiyev ve ark., 2004).

2.2.2. HSV üzerine Etkili Uçucu Yağlar

Ne yazık ki, son zamanlarda antiherpetik ilaçlara karşı direnç bildirilmiştir. Bu nedenle, HSV enfeksiyonlarıyla başa çıkmak için yeni antiviral ajanların araştırılmasına acil bir ihtiyaç vardır (Allahverdiyev ve ark., 2004).

Uçucu yağlar, tıbbi ve aromatik bitkilerin çiçeklerinden, yapraklarından, kabuklarından, gövdelerinden ve köklerinden başta distilasyon olmak üzere, presleme ve süperkritik ekstraksiyon gibi çeşitli tekniklerde elde edilen kokulu ve renksiz veya hafif renkli ürünlerdir. Fenoller, monoterpenler ve ketonlar gibi kimyasallar açısından zengindirler (Serag ve ark., 2022). Uçucu yağlarda bulunan çok sayıda biyoaktif bileşiklerin çeşitli terapötik etkileri nedeniyle eski zamanlardan beri kullanılmaktadır. Literatürde de insan vücudu ve sağlığı üzerinde çeşitli sağlık yararları ve etkileri olduğunu gösteren çok sayıda çalışmaya rastlamak mümkündür. İçerdikleri bileşenlerin moleküler çeşitliliği, onlara çok çeşitli roller ve biyolojik özellikler verir. Uçucu yağlar, antimikrobiyal ajanlar olarak iyi bilinir ve dolayısıyla antiseptik olarak kullanılabilirler. Terpen bileşenlerinden dolayı iyileştirici, yatıştırıcı, sindirimi kolaylaştırıcı veya antispazmodik özelliklere sahiptir. Ayrıca pek çok uçucu yağ ağrı türlerine karşıda aktivite gösterir ve antienflamatuvar özelliklerinden dolayı eklem bozukluklarını tedavide de kullanılmakta olup, bağışıklığı güçlendirme ve canlandırma özelliğine sahiptir. Ek olarak, bazı uçucu yağlar (Çörek otu, Melisa) belirli kanser türlerinde anti-tümör aktivitelere sahiptir ve önleyici tedavisinde benimsenmiştir (Selmi ve ark., 2022).

Antiviral aktivite

Son zamanlarda da, geleneksel şifalı bitkilerin ve özlerin güçlü antiviral aktiviteye sahip olduğu ve bazılarının herpes simpleks enfeksiyonları da dahil olmak üzere viral enfeksiyonların tedavisinde kullanıldığı gösterilmiştir (Allahverdiyev ve ark. 2004). Bitkilerde bulunan alkaloidler, terpenler, polisakkaritler, flavonoidler, fenolik asitler ve steroidler gibi biyoaktif maddeler HSV-1 ve HSV-2'ye karşı antiviral aktif maddeler olarak tanımlanmıştır (van de Sand ve ark., 2021).

Literatürde ardıç yağı, okaliptüs yağı, biberiye yağı, çay ağacı yağı, fesleğen yağı, lavanta yağı, kekik ve karanfil uçucu yağlarının birkaç zarfsız RNA ve DNA enfeksiyonuna karşı antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Ek olarak, zencefil, kekik, mercanköşk otu ve sandal ağacı uçucu yağlarının HSV-1'e karşı engelleyici aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Kashyap ve ark., 2022). Ayrıca kekik ve karanfilden elde edilen uçucu yağların, adenovirüs tip-3, coxsackievirus B-1 ve çocuk felci virüsü dahil olmak üzere bazı zarfsız DNA ve RNA virüsüne karşı dikkate değer bir antiviral etki gösterdiği bildirilmiştir. Monoterpenler, seskiterpenler ve triterpenler gibi uçucu yağların çeşitli bileşenlerinin, rinovirüs ve herpes virüsüne karşı da güçlü antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bir çalışmada Paçuli (*Pogostemon cablin*) uçucu yağ bileşenlerinin de H2N2 influenza-A virüsüne karşı aktif olduğu gösterilmiştir (Nazir ve Gazgoo, 2022).

Saltolinia uçucu yağının, HSV-1 ve HSV-2'ye karşı enfekte hücrelerde hücreden hücreye virüsün yayılmasını önlediği ve antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Yağın, virüs parçacıklarını doğrudan etkisiz hale getirdiği ve böylece virionun konakçı hücrelere adsorpsiyonunu önlediği gösterilmiştir. Yaygın bir monoterpen alkol olan izo-borneolün, HSV-1'e karşı virüsidal aktivite gösterdiği ve viral polipeptitlerin glikozilasyonunu spesifik olarak inhibe ettiği belirtilmektedir. Uçucu yağın antiviral aktivitesi, esas olarak doğrudan virüsidal etkilerden (viral yapısal proteinleri veya glikoproteinleri denatüre ederek) kaynaklanır. Önerilen mekanizmalar, esansiyel yağların, viral replikasyon döngüsündeki belirli süreçleri inhibe ederek veya adsorpsiyon veya konakçı hücrelere giriş için gerekli olan viral faktörleri maskeleyerek virüs zarfına girdiğini ve dolayısıyla hücreden hücreye virüs yayılmasını engellediğini öne sürmektedir (Nazir ve Gazgoo, 2022).

2.2.2.1. Melisa Uçucu Yağı

Melisa (*Melissa officinalis*), Lamiaceae familyasına ait geleneksel bitkisel ilaçlardan biridir. Bu şifalı bitki Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya'da yetişir. Yapraklar, kurutulmuş bitki bazında en az %0,05 (v/w) uçucu yağlar içerir. *Melissa officinalis* bitki görseli Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2-3: Melisa (*Melissa officinalis*)

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melissa_officinalis_sl4.jpg)

***Melissa officinalis*'in fitokimyasal bileşenleri ve farmakolojik etkileri:**

Melissa officinalis, ağırlıklı olarak uçucu yağlar (sitronellal, mentol, öjenol, linalool, pinokarvon ve geraniol dahil) ve polifenoller (rosmarinik asit, kafeik asit dahil) içeren organik aktif bileşenler açısından zengin terapötik bir bitkidir. Muhtemel terapötik kullanımları arasında anti-inflamatuar etkiler, anti-diyabetik etkiler, anti-proliferatif etkiler, anti-anjiyojenik etkiler, anti-depresan etkiler, anti-kanser etkileri, antioksidan etkiler, anti-mikrobiyal etkiler, anti-epileptik etkiler ve kardiyο-koruyucu etkiler yer almaktadır. Ana bileşenler, citronellal, sitral a ve sitral b'nin yanı sıra diğer monoterpenler ve seskiterpenlerdir. Diğer bileşenler, triterpenilik asit, acı maddeler ve flavonoidler ve Lamiaceae'ye özgü tanenlerdir (Allahverdiyev ve ark., 2004).

Melisa, uçuk virüs ailesindeki virüslerle savaşmada etkili olduğu için genellikle uçuk tedavisinde tercih edilen bitkidir. Yaygın olarak kullanılan antiviral ajanlara karşı direnç geliştiren kişiler için özellikle yararlı olabilecek viral enfeksiyonların yayılmasını

engellemek için kullanılabilir (Astani ve ark., 2014). Melisa bitkisinde baskın fenolik bileşik olan rosmarinik asitin, virüsidal etkinin ana katkı maddesi olduğu ve herpes viral bağlanmayı önemli ölçüde engellediği, viral tutunmayı inhibe ettiği ve asiklovire duyarlı ve asiklovire dirençli herpes virüsleri ile HSV enfeksiyonları için topikal bir ajan olarak tercih edilebileceği bildirilmiştir. İn vitro olarak *M. officinalis* ekstresinin antiherpetik etkiyi göstermekte olduğu ve tekrarlayan herpes enfeksiyonunun topikal tedavisinde geleneksel kullanımını desteklemekte olduğu ifade edilmiştir (Johnson, 2015). Melisa bitki ekstreleri gibi uçucu yağının da HSV üzerinde etkinliğini gösteren çalışmalara literatürde rastlanmaktadır. Melisa, uçucu yağının %0,01 ila %0,25 arasında değişen ana bileşenleri %39 sitronellal, %33 sitral (citronellol, linalool) ve geranioldür.

Phytomedicine'de yayınlanan 2008 tarihli bir araştırmada, yüksek konsantrasyonlarda melisa uçucu yağının, bir plak azaltma tahlili kullanılarak maymun böbrek hücreleri üzerinde test edildiğinde, HSV-1 ve 2'yi neredeyse tamamen ortadan kaldırdığı bildirilmiştir (Koch ve ark., 2008). Araştırmacılar, melisa uçucu yağının antiviral etkileri olduğu ve lipofilik yapısı nedeniyle cilde nüfuz edebildiği için uçuktan kurtulmak için uygun bir topikal tedavi işlevi gördüğünü belirtmiştir (Schnitzler ve ark., 2008). İn vitro araştırmalarda aynı zamanda melisa yağının HSV-1'in konak hücrelere bağlanmasını (adsorpsiyon) önlediği ve düşük konsantrasyonlarda HSV-1'i öldürdüğü sonucuna varıldığı da bildirilmiştir (Johnson, 2015).

Melisa ekstresinin, HSV-2 virüsünün hücrelere girişini engelleyemediği, ancak virüsün konakçı hücreye girmesinden sonra etki gösterdiğini bildiren çalışma da mevcuttur. Bununla birlikte, HSV-1 ve HSV-2 virüsleri enfeksiyondan önce melisa yağı ile tedavi edildiğinde viral enfektivitede tipik bir azalma gözlemlendiği dolayısıyla muhtemelen doğrudan ilaç-virüs etkileşiminden dolayı yüksek bir antiviral aktivite tespit edildiği bildirilmiştir (Schnitzler ve ark., 2008; Pourghanbari ve ark., 2016).

2.2.2.2. Yıldız Anason Uçucu Yağı

Yıldız anason veya Çin yıldız anasonu olarak da bilinen *Illicium verum*, Schisandraceae familyasının bir üyesidir. *I. verum*, kuzeydoğu Vietnam ve güneybatı Çin'in küçük, yerel, yaprak dökmeyen orta büyüklükte meyveleri yıldız şeklinde olan bir ağacıdır. Asya kıtasının güneybatı kesimlerinde geniş dağılım gösteren önemli bir

bitkidir. Yıldız anason bitki görseli Şekil 2.4’de gösterilmiştir. Yıldız anason esansiyel yağı (SAO), yıldız anason meyvelerinden (*Illicium verum*) ekstrakte edilen uçucu bir yağdır ve yüksek oranda anason aromasına sahiptir. Mutfakta baharat olarak kullanılmasının yanı sıra yıldız anason, Çin şifalı bitkilerinin hayati bileşenlerinden biridir ve antiviral etkileri ile yaygın olarak bilinir. Antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinden dolayı gıda ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Son birkaç yılda, birçok makale SAO'nun in vitro antifungal ve antioksidan aktivitelerini bildirmiştir. Aynı zamanda, influenza A ve influenza B için antiviral bir ilaç olan oseltamivir (Tamiflu®) üretiminde kullanılan prekürsör molekül olan şikimik asitin de kaynağıdır. Şikimik asit, antiviral ilaç oseltamivir'in (Tamiflu®) sentezi için önemli bir ara maddedir. Şikimik asit, kimyasal sentez, mikrobiyal fermantasyon ve belirli bitkilerden ekstraksiyon yoluyla üretilir. Alternatif bir üretim yolu, daha kolay bulunabilen kinik asidin biyotransformasyonudur. Mevcut şikimik asit arzının çoğu, Çin yıldız anasonunun (*Illicium verum*) tohumlarından elde edilmektedir (Ghosh ve ark., 2012). Antiviral potansiyel dışında, yıldız anason antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antelmintik, insektisidal, sekretolitik, antinosiseptif, antiinflamatuvar, gastroprotektif, sedatif özellikler, balgam söktürücü ve spazmolitik ve östrojenik etkiler gibi bir dizi başka potansiyele sahiptir (Patra ve ark., 2020).



Şekil 2-4: Yıldız Anason (*Illicium verum*)

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Star_anise.jpg)

SAO'nun ana bileşeni trans-anetol olduğu için yüksek oranda anason aromasına sahiptir. *I. verum* uçucu yağındaki ortalama trans-anetol içeriği %72-92 civarındadır (Sharafan ve ark., 2022). Tatlı tadı ve aromatik kokusu nedeniyle gıda, parfüm ve ilaç endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, son araştırmalara göre trans-anetol, kozmetik ve tıp açısından da önemli olan antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-obezite özelliklerine sahiptir.

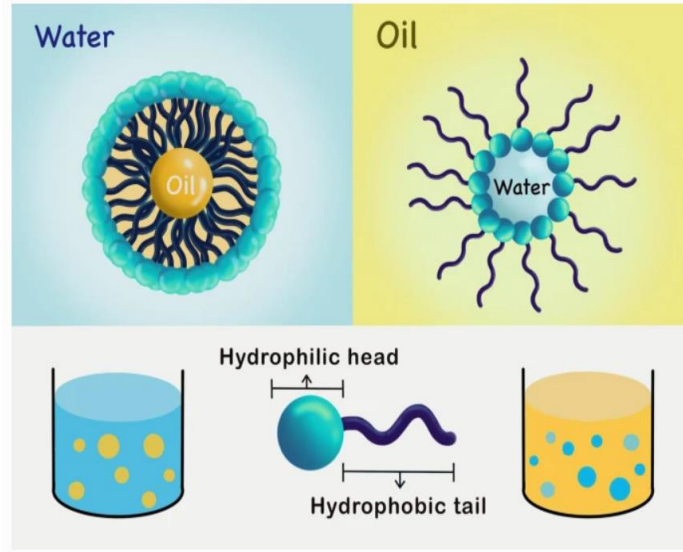
Yıldız anason uçucu yağı, bodur çam yağı ve papatya yağı ile yapılan araştırmalarda antiviral etkileri açısından ilginç sonuçlar bildirilmiştir. TK pozitif (asiklovire duyarlı) ve TK negatif (asiklovire dirençli) gibi farklı TK türlerine karşı anason yağı, bodur çam yağı ve papatya yağı ile yapılan çalışmalar, HSV-1 için tüm bu uçucu yağların, herpes virüslerinin adsorpsiyonunu kesintiye uğratarak, asiklovire duyarlı HSV suşu ve asiklovire dirençli klinik HSV izolatlarının yanı sıra asiklovire dirençli Angelotti türüne karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Rapor, bu yağların HSV üzerinde doğrudan bir etki gösterebildiğini ve ilaca dirençli virüslerin tedavisinde yararlı olabileceğini belirtmiştir (Koch ve ark., 2008). Astani ve ark., (2011), yıldız anason esansiyel yağının HSV-1'e karşı antiviral aktivitesini in vitro koşullar altında değerlendirmiştir. Benzer şekilde, HSV-2 üzerinde bir plak azaltma testi kullanılarak RC-37 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen başka bir anason uçucu yağ çalışmasında ise, %0,016'lık IC50 değerinde bir inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Koch ve ark., 2008).

Hem yıldız anason esansiyel yağının hem de bu bitkiden izole edilen tüm bileşiklerin, viral süspansiyon deneylerinde serbest virüs partiküllerinin doğrudan inaktivasyonu yoluyla anti-HSV-1 aktivitesi sergilediği bildirilmiştir. Test edilen tüm ilaçlar, herpes virüsü partikülleri ile doza bağlı bir şekilde etkileşime girerek viral enfektiviteyi etkisiz hale getirmiş, bununla birlikte trans-anetol bakımından zengin yıldız anason yağı, HSV'ye karşı yüksek bir seçicilik indeksi (160) ortaya çıkarırken, izole edilmiş bileşikler arasında sadece β -karyofillen 140'lık yüksek bir seçicilik indeksi sergilemiştir. Yıldız anason esansiyel yağı ve çoğu bileşik, viral süspansiyon testlerinde HSV-1'e karşı yüksek düzeyde antiviral aktivite sergilemiş ve maksimum sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda, yıldız anason yağı plak oluşumunu >%99 oranında önemli

ölçüde azaltmış, fenilpropanoidler ve seskiterpenler viral enfeksiyonu sırasıyla %60-80 ve %40-98 oranında baskılayabilmiştir (Astani ve ark., 2011).

2.3. Nanoemülsiyonlar

NE'ler, ilaç moleküllerinin taşıyıcıları olarak görev yapan mikron altı boyut aralığındaki kolloidal parçacıklı sistemlerdir. Bir ilaç dağıtım sistemi olarak, ilacın terapötik etkinliğini arttırırlar, yan etkileri ve toksik reaksiyonları en aza indirirler. NE'ler, yüzey aktif maddeler tarafından stabilize edilmiş tipik olarak yağ ve su karışımları olan iki farklı karışmaz sıvının heterojen formülasyonlarıdır (Şekil 2.5). Emülsifikasyon sırasında yüzey aktif maddeler, yağ-su arayüzünde adsorbe olarak ve yüzey gerilimini düşürerek birleşmeyi en aza indirir veya önler. Yüzey aktif maddelerin seçimi, belirli fizikokimyasal özelliklere sahip NE'lerin hazırlanması için kritik öneme sahiptir. NE'ler, 10 ila 1000 nm arasında değişen damlacık boyutlarına sahiptir, bu da onları daha yüksek serbest enerji nedeniyle kinetik olarak kararlı ancak sistemdeki ayrılmış fazlara kıyasla termodinamik olarak kararsız sistemler yapar. Bu nedenle, homojenleştirilmiş NE'lerin kinetik enerji bariyerlerine bağlı olan faz ayrımı, zamanla Ostwald olgunlaşması ve flokülasyon dahil olmak üzere kararsızlaştırma mekanizmalarına yol açarak gerçekleşir. Bununla birlikte, sistem bileşenleri fizyokimyasal özelliklerine göre rasyonel olarak seçildiğinde, NE'ler uzun vadeli stabiliteye veya raf ömrüne sahip olabilir. Bir emülsifiye edici maddenin (emülsiyon veya emülgatör) mevcudiyeti ile stabilize edilebilirler (Jaiswal ve ark., 2015; Tayeb ve ark., 2021).



Şekil 2-5: Su içinde yağ ve yağ içinde su emülsiyonları (Ashaolu, 2021).

2.3.1. Nanoemülsiyonların Avantajları (Jaiswal ve ark., 2015)

- Lipozomlar ve veziküllerin ikamesi olarak kullanılabilirler,
- İlacın biyoyararlanımını artırır,
- Doğası gereği toksik değildir ve tahriş edici değildirler.
- Geliştirilmiş fiziksel stabiliteye sahiptirler,
- NE'ler, daha fazla emilim sağlayan daha büyük yüzey alanına sahip küçük boyutlu damlacıklara sahiptirler,
- NE'ler, kremler, köpükler, sıvılar ve spreyler gibi çeşitli formülasyonlarda formüle edilebilirler,
- Hücre kültürü teknolojisinde yağda çözünen takviyelerin daha iyi alınmasını sağlarlar,
- Lipofilik ilacın çözünmesine yardımcı olurlar,
- Tat maskelemede faydalıdır,
- Daha az miktarda enerji gereklidir.

2.3.2. Nanoemülsiyonun Dezavantajları ve Sınırlılıkları

NE'lerin ilaç taşıyıcıları olarak büyük potansiyeline rağmen, üretimi, fiziksel ve biyolojik stabilitesi, klinik çevirisi ve endüstriyel ölçeklenebilirliği ile ilgili birçok zorluğun üstesinden gelinmesi gerekir. NE'lerin üretiminde en uygun ilaç kapsülleme

yönteminin seçilmesi son derece önemli bir karardır. Stabilitate ve raf ömrü, farmasötik NE formülasyonlarının geliştirilmesinde önemli hususlardır. NE stabilitesi, sıcaklık ve pH gibi çevre koşullarından etkilenebilir. İstenen kararlılığı elde etmek için yüksek konsantrasyonda yüzey aktif maddeler/yardımcı yüzey aktif maddeler kullanılması da dezavantajları arasındadır. Ayrıca NE'lerin termodinamik kararsızlığı nedeniyle, boyut ve yüzey yükü gibi fiziksel özelliklerini değiştirerek zaman içinde faz ayrımı meydana gelir. Bu fiziksel değişiklikler, NE'lerin farmakolojik performansını ciddi şekilde etkiler ve olumsuz sağlık sonuçlarına neden olabilir (Tayeb ve ark., 2021). Damlacık boyutu küçültülmesinin zor olması, özel aletler ve işlemler gerektirmesi de NE formülasyonunu pahalı bir proses haline getirmektedir. Ayrıca çok küçük damlacık boyutundan kaynaklanan Ostwald olgunlaşmasında NE'lere hasar verdiği ve uygulanmalarını kısıtladığı rapor edilmiştir (Xin ve ark., 2012). Eriyebilirlikleri yüksek maddeler için kısıtlı çözünme kapasitesi mevcuttur. Formülasyon uzun süre saklanırsa, NE stabilitesinin etkilenmesi de söz konusu olabilmektedir. Ayrıca düşük viskozite ile ilgili yayılabilirlik sorunları ve ciltte zayıf tutma sorunlarıyla karşı karşıyadır (Sengupta, 2017; Khurana ve ark., 2013). Bu tür dezavantajlar, topikal uygulama için NE platformunun klinik uygulamasını kısıtlar (Sengupta, 2017; Mou ve ark., 2008).

2.3.3. Nanoemülsiyon Bileşimi

Y/S tipi NE'ler esas olarak, dağılmış faz (hidrofobik çekirdek), sürekli faz (hidrofilik) ve yüzey aktif maddeler veya dengeleyiciler olmak üzere üç ana bileşenden oluşan heterojen dispersiyonlardır. Çekirdek, birçok hidrofobik malzeme için bir rezervuar görevi görürken, hidrofilik faz içinde tuzlar, tamponlar veya çözücüler bulunur. Sürfaktanlar, emülsifikasyon işlemi sırasında karışmayan iki sıvı arasındaki arayüzey gerilimini düşüren amfifilik yüzey aktif moleküllerdir. Sürfaktanlar Y/S arayüzlerinde hızla adsorbe olur ve topaklanma (yani daha büyük kümeler oluşturan damlacıkların füzyonu) gibi kararsızlaştırma mekanizmalarını önleyerek kararlı yağ damlacıklarının oluşumunu sağlar (Tayeb ve ark., 2021).

2.3.4. Nanoemülsiyonların Hazırlama Yöntemleri

NE formülasyonu aktif ilaç, katkı maddesi ve emülgatör içerir. NE hazırlanmasına yönelik çeşitli yöntemler iki yöntemi içerir:

(a) Yüksek enerjili emülsifikasyon: Bu yöntem yüksek enerjili karıştırmayı, ultrasonik emülsifikasyonu, yüksek basınçlı homojenleştirmeyi, mikro-akışkanlaştırmayı

ve membran emülsifikasyonunu içerir (Tiwari ve Amiji, 2006; Perdiguier ve ark., 1997 ; Banker ve ark., 2002).

(b) Düşük enerjili emülsifikasyon: Faz dönüşüm sıcaklığını, emülsiyon dönüşüm noktasını ve kendiliğinden emülsifikasyonu içerir (Ahuja ve ark., 2008).

Yüksek enerjili ve düşük enerjili emülsifikasyonu içeren birleşik bir yöntem kullanılarak, oldukça viskoz bir sistemde ters nanoemülsiyon hazırlamak mümkündür.

Ultrasonik emülsifikasyon: Damlacık boyutunu küçültmede çok etkilidir. Ultrasonik emülsifikasyonda enerji, sonikatör probu adı verilen sonotrodlar aracılığıyla sağlanır. Sonikatörün ucu sıvı ile temas ettiğinde mekanik titreşim üretir ve kavitasyon meydana gelir. Kavitasyon, sıvı içinde buhar boşluklarının oluşması ve çökmesidir. Bu nedenle, emülsiyon üretmek için ultrason doğrudan kullanılabilir.

Yüksek basınçlı homojenleştirme: NE'nin hazırlanması, yüksek basınçlı homojenizasyon gerektirir. Bu teknik, son derece düşük partikül boyutlu (1 nm'ye kadar) NE üretmek için yüksek basınçlı homojenleştirici/piston homojenleştirici kullanır (Asua 2002; Anton ve ark., 2008).

Mikroakışkanlaştırma: Mikroakışkanlaştırma, mikroakışkanlaştırıcı adı verilen bir cihazdan yararlanan patentli bir karıştırma teknolojisidir. Bu cihaz, ilaç ürününü etkileşim odası boyunca zorlayan ve mikron altı aralığın çok ince bir partikülüyle sonuçlanan yüksek basınç kullanır. Üniform NE üretmek ve istenen damlacık boyutunu elde etmek için işlem birkaç kez tekrarlanır.

Faz dönüşüm sıcaklığı: Bu yöntem, bir mikroemülsiyona daha yüksek bir sıcaklık uygulayarak faz değişimini içerir (El-Aasser ve ark., 1986; Pouton, 1997).

Spontan emülsifikasyon Üç aşamadan oluşur:

(a) suyla karışabilen çözücü ve hidrofilik yüzey aktif madde içinde yağ ve lipofilik yüzey aktif maddeden oluşan homojen organik çözeltinin hazırlanması,

(b) organik faz, sürekli manyetik karıştırma altında sulu faza enjekte edilir, Y/S emülsiyonu oluşturulur,

(c) sulu faz, indirgenmiş basınç altında buharlaştırılarak çıkarılır (Solans ve ark., 2005 ; Tadros ve ark., 2004).

Nanoemülsiyonun hazırlanması sırasında dikkate alınması gereken faktörler

1. Yüzey aktif madde, NE üretmek için birincil gereklilik olan ultra düşük bir arayüzey gerilimi elde edilebilecek şekilde dikkatli bir şekilde seçilmelidir.
2. Sürfaktanın konsantrasyonu, NE üretmek için mikro damlacıkları stabilize edecek kadar yüksek olmalıdır.
3. Sürfaktan, NE oluşumunu desteklemek için yeterince esnek veya sıvı olmalıdır.

2.3.5. Nanoemülsiyon Stabilesini Etkileyen Faktörler

Uzun süreli depolama sırasında stabilite, yeni ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi için önemlidir. Kararlı NE'ler, ayrılmış fazlara (yağ ve su) kıyasla yüksek enerji durumundadır. Y/S tipi NE, formülasyonun fizikokimyasal özelliklerini sıcaklık ve pH değişiklikleri de dahil olmak üzere farklı koşullar altında ve zaman içinde koruyorsa kararlı kabul edilir. Fizikokimyasal özelliklerdeki değişim oranı, enerji bariyeri seviyeleri tarafından belirlenir. Örneğin, NE fizikokimyasal özelliklerindeki değişiklikler, Ostwald olgunlaşması, koalesans, flokülasyon, kremalaşma, sedimentasyon ve faz ayrımı gibi farklı mekanizmalar yoluyla kararsızlığa yol açabilir. Ostwald olgunlaşması, Laplace basıncındaki farklılıklardan kaynaklanır ve küçük yağ damlacıkları sürekli faz boyunca daha büyük damlacıklara doğru hareket ettiğinde meydana gelir. Bu mekanizma, dağılan ve sürekli fazlar arasında yüksek bir karışmazlık profiline yol açar (Tayeb ve ark., 2021).

Flokülasyon, kremalaşma ve sedimentasyon: Flokülasyon, emülsiyon içinde tek tek globüllerden daha hızlı yükselen veya yerleşen büyük kümeler veya topakları oluşturmak için küreciklerin bir araya gelmesinden oluşur. Konsantre bir tabaka oluşturmak için dağılmış globüllerin yükselmesi veya çökmesi kremalaşma ve sedimentasyon olarak bilinir.

Faz ayrımı: Bir emülsiyonun fazlarının, dağılmış fazın bir tabaka halinde ayrılmasını ifade eder. Faz ayrımı kalıcı bir stabilite sorunudur.

Emülsiyonun fazlarının ayrılması şunlardan kaynaklanabilir:

- (1) zıt yüklü bir emülgatörün eklenmesi,
- (2) emülgatörün ayrışması veya çökmesi,
- (3) hem yağlı hem de sulu fazların karışabildiği ortak bir çözücünün eklenmesi,

- (4) yüksek sıcaklıklar,
- (5) mikroorganizmalar,
- (6) kremalaşma.

Emülsiyonlar, aşırı yüksek veya düşük sıcaklıkta veya ışık varlığında depolanırsa bozulabilir. Bu nedenle emülsiyonlar genellikle hava geçirmez, renkli kaplarda paketlenir ve orta sıcaklıkta saklanır.

Faz dönüşümü: Emülsiyon tipinin Y/S'den S/Y'ye veya tam tersine değişmesidir. Fiziksel bir süreçtir. Faz inversiyonu, faz hacim oranı değiştirilerek, elektrolitlerin eklenmesiyle ve sıcaklık değişiklikleri ile sağlanabilir (Jaiswal ve ark., 2015).

2.3.6. Nanoemülsiyonların Karakterizasyonu

NE'ların fizyokimyasal ve arayüz özelliklerinin karakterizasyonu (örn. reoloji, görünüm, viskozite, damlacık boyutu, yük, morfoloji, boyut dağılımı, yüzey gerilimi, elastikiyet ve sertlik), NE davranışının ve tıbbi uygulamalardaki olası etkileşimlerin daha iyi anlaşılmasını sağlar. Brownian hareketine dayanan dinamik ışık saçılımı (DLS), NE'lerin en yaygın karakterizasyon yöntemidir ve damlacık boyutunu gösterir. Damlacık boyutu (ortalama damlacık çapı) ve polidispersite indeksi (PDI), NE'ların fonksiyonel özelliklerini, kararlılık ve dağılımlırlığını yansıtan önemli parametrelerdir. Bu nedenle, bu parametrelerin düzenli olarak izlenmesi gereklidir. Her iki parametre de zaman içinde değişmeden kaldığında, NE'ler fiziksel olarak kararlı kabul edilebilir. DLS, nanomalzeme stabilite profillerinin sürekli izlenmesi için yaygın olarak kullanılan uygun ve verimli bir yöntemdir ancak DLS, test numuneleri düşük yüzdeli damlacık popülasyonları içerdiğinde eksik bilgi sağlayabilir. DLS sonuçlarını tamamlamak için mikroskobik inceleme gibi diğer teknikler kullanılabilir.

Elektron mikroskobu, damlacık yapısı ve boyutunun daha yüksek çözünürlüklü incelemesini sunar. Geleneksel transmisyon elektron mikroskobu (TEM) dağılmış fazın iç yapısını karakterize ederken, taramalı elektron mikroskobu (SEM) topografik verileri toplar. Geleneksel TEM ve SEM'e ek olarak, birkaç nedenden dolayı kriyo elektron mikroskobu daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Tayeb ve ark., 2021).

2.3.7. Nanoemülsyonların Kozmetikte Uygulama Alanları

Derideki epidermal tabakalar, topikal olarak uygulanan ilaç formülasyonlarının difüzyonunu engelleyen, çevreleyen ortama karşı bariyer görevi görür. Topikal olarak uygulanan NE'ler, penetrasyon derinliğine bağlı olarak lokal (dermal) veya sistemik (transdermal) olarak iletilebilir. Dermal tabakalarda NE'lerin birikmesi lokal ilaç salımına neden olurken, sürfaktanlar veya penetrasyon artırıcılar kullanılarak yüksek termodinamik aktivite yoluyla stratum corneum bozulması sistemik salıverime yol açar. Topikal olarak uygulanan NE'lerin içsel özellikleri, kapsüllenmiş hidrofobik bileşiklerin cilt katmanları yoluyla emilimini artırır. Yüzeyde sergilenen sürfaktanlar ve NE'lerin düşük yüzey gerilimi, yüklü maddelerin deri katmanları boyunca penetrasyonunu ve nüfuz etmesini teşvik eder (Tayeb ve ark., 2021).

NE'ler, kozmetiklerin kontrollü dağıtımı ve aktif bileşenlerin belirli cilt katmanlarında optimize edilmiş dağılımı için potansiyel araçlar olarak kişisel bakım ürünlerinde uygulama için son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Geleneksel dağıtım sistemlerine kıyasla bitkisel ilaçların artan yüklemesi, üretiminin basitliği, iyileştirilmiş terapötik etkinliği ve stabilitesine yönelik ilgiyi de çekmiştir (Harwansh ve ark., 2019). Ayrıca NE'lerde kullanılan bazı yağların hafife alınmaması gereken bazı yararları olduğu ve aromatik bileşikler ve esansiyel yağlar gibi uçucu bileşenlerin kapsüllenmesinde faydalı olabileceği belirtilmelidir (Ashaolu, 2021).

Deri beyazlatıcı etkisi olan kojik dipalmitat içeren Y/S tipi NE, emülsiyon dönüşüm noktası yöntemi kullanılarak yaklaşık 300 nm damlacık boyutunda elde edilmiş ve fizikokimyasal çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen sistemden dolayı nanokrem olarak ifade edilmiştir.

2.4. Nanoemüljel Tanımı

Emüljel, seçilen ilacı cilde iletmek amacıyla bir araç olarak kullanılan emülsiyonun hem S/Y hem de Y/S tipi olabileceği bir jel ve emülsiyon kombinasyonudur. Nanoemüljel, lipofilik ilaçların terapötik profilini geliştirmeyi amaçlayan, gelişmekte olan bir ilaç dağıtım sistemidir. NE içeren ilacın bir jel bazına dahil edildiği iki farklı sistemden oluşur. Bu iki sistemin füzyonu, bu formülasyonu çeşitli şekillerde avantajlı hale getirir. Nanoemüljel ilaç dağıtım sistemi, lipofilik ilaçların ilaç emilimini ve terapötik profilini iyileştirmek için formülasyonla ilgili bir müdahaledir. Lipofilik ilaçlar kolayca dahil edilebilir ve dahil edilen ilaçların cilt geçirgenliğini, jel

fazında ince bir şekilde dağılmış yağ damlacıkları nedeniyle birkaç kat arttırılabilir. Eşzamanlı, daha spesifik olarak etki bölgesine hedeflenebilir ve ilk geçiş metabolizmasını önleyebilir ve kullanıcıyı gastrik/sistemik uyumsuzluklardan kurtarabilir. Formülasyonun yağsız olması, kolay sürülebilir olması, kolay uygulanabilirliği ve iyi terapötik ve güvenlik profili nedeniyle hastalarda daha iyi kabul görmesi nedeniyle son yıllarda nanoemüljel kullanımında artan bir eğilim fark edilmiştir. Birkaç sınırlamaya sahip olmasına rağmen, nanoemüljel formülasyonu, gelecekte lipofilik ilaçların topikal uygulaması için potansiyel ve gelecek vaat eden adaylar olarak kabul edilebilir.

Topikal ilaç dağıtımı için ortaya çıkan bir teknik olan nanoemüljel, şu anda egzama, Herpes simpleks, akne, viral, bakteriyel ve mantar vb. enfeksiyonlardan kaynaklanan çeşitli cilt bozukluklarının tedavisinde araştırılmaktadır (Alexander ve ark. 2013). Nanoemüljel sisteminin yüksek çözünürlük ve daha iyi adezyon özellikleri, cilt boyunca daha büyük konsantrasyon gradyanına yol açarak daha iyi cilt penetrasyonu sağlar (Gannu ve ark. 2010). Nanoemüljel sisteminin daha da geliştirilmiş tiksotropik özellikleri, yağsız, leke bırakmayan, yumuşatıcı, iyi yayılabilir, çıkarılması kolay ve hoş görünümlü olması kabul edilebilirliğini desteklemektedir (Eid ve ark., 2014).

Geleneksel emüljel ile nanoemüljel arasındaki karşılaştırma Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: Geleneksel emüljel ile nanoemüljel arasındaki karşılaştırma (Donthi ve ark., 2023).

Parametre	Geleneksel Emüljel	Nanoemüljel
Termodinamik Kararlılık	Sedimentasyona veya kremalaşmaya yol açan doğal birleşme eğilimi nedeniyle stabil değil	Kararlı – daha küçük parçacık boyutları nedeniyle, Brownian hareketi yerçekimine karşı yeterli kararlılık sağlayarak tortulaşmayı veya kaymayı önler.
Parçacık Boyutu	>500 nm'den büyük	100 nm'den az
Biyoyararlanım	Nanoemüljele kıyasla nispeten daha az biyoyararlanım	Küçük boyut ve geniş yüzey alanına atfedilen gelişmiş biyoyararlanım

Permeasyon	Nispeten daha düşük permeasyon	Düşük damlacık boyutu sayesinde yüksek permeasyon
Üretim	Yüksek enerji teknikleri gerektirir	Yüksek veya düşük enerji teknikleri kullanılarak hazırlanabilir
Sistemik Absorpsiyon	Çok az	Küçük damlacık boyutu ve geniş yüzey alanı nedeniyle geleneksel emüljel ile karşılaştırıldığında daha yüksek.
BBB'yi Geçme Yeteneği	BBB'yi geçemez	Küçük parçacık boyutundan dolayı BBB'yi geçebilir.

2.4.1. Nanoemüljelin Avantajları

- NE'nin stabilitesi, jel bazındaki yağ damlacıklarının dağılımı nedeniyle artırılmıştır.
- Ayrıca yüksek çözündürme gücü ile deri üzerinde iyi adezyon, aşağı doğru hareket ederken ilacın penetrasyonunu artıran yüksek konsantrasyon gradyanına yol açar.
- Ayrıca, bu tür formülasyonlar, lipofilik ve suda çözünürlüğü az olan ilaçların verilmesini destekler ve ayrıca hasta uyuncunu geliştirir.
- Nanoemüljel ayrıca daha kısa yarı ömre sahip ilaçların kontrollü salınımına da yardımcı olur.
- Formülasyonun kremlere göre daha yüksek yayılma kabiliyeti göstermesini sağlar.
- Nanoemüljel toksik değildir ve tahriş edici değildir.
- Diğer formülasyon tiplerine kıyasla ilacın daha iyi yüklenmesini sağlar.
- Cilt geçirgenliğini artırır.

2.4.2. Nanoemüljelin Sınırlılıkları

Belirgin avantajlara rağmen, kararlılıkla ilgili konulara hazırlık yöntemi dahil olmak üzere nanoemüljel ilaç verme sistemi için üstesinden gelinmesi gereken bazı mevcut zorluklar vardır. NE'nin hazırlanması yüksek enerji gerektirir. Az sayıda düşük

enerjili yöntem olmasına rağmen, bunlar büyük ölçekli üretim için mükemmel şekilde uygun değildir ve normalde daha yüksek miktarlarda yüzey aktif maddeye ihtiyaç duyar (Sharma ve ark., 2010). Ancak yüksek miktarda sürfaktan kullanımı ciltte tahriş ve kontakt dermatite neden olabilir. Nadiren nanoemüljelin ciltte alerjik reaksiyonlar gösterdiği bildirilmiştir (Sharma ve Shah, 2016).

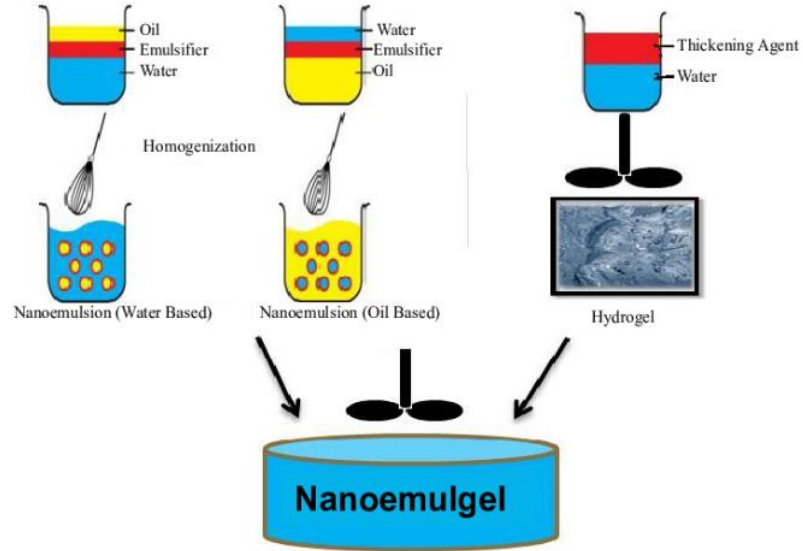
NE hazırlama için sınırlı tipte yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif maddenin mevcudiyeti de dikkate değer bir sorun olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, nanoemüljel formülasyonları, ortalama moleküler ağırlığı 400 Da'dan fazla olan büyük ilaç molekülünü deriden geçirme kabiliyetine sahip değildir (Sharma ve Shah, 2016).

Bir diğer önemli konu da jel fazının stabilitesidir. Jelleştirici ajanların çoğu sıcaklık ve pH'a oldukça duyarlıdır. Örneğin, yaygın olarak kullanılan jelleştirme maddesi karbopol, dar bir pH aralığında jelleşme özelliği göstermektedir. Bu pH aralığının altında veya üstünde jelleşme özelliğini kaybeder ve çatlayabilir. Asidik veya alkalinin saklama kabından sızması, müstahzarın pH'ını değiştirebilir ve jelin kararsızlığına yol açabilir. Depolama sırasında ürünün sıcaklığındaki değişiklik de jelin çatlamasına neden olabilir. Yine, NE'nin jele dahil edilmesi kritik bir olgudur. Düşük hızda karıştırma homojenleştirme, üniform veya homojen bir karışım üretemezken, aşırı karıştırma hızı jelin çatlamasına neden olur.

2.4.3. Nanoemüljellerin Hazırlanması

Nanoemüljel üretiminde iki adım yer alır. İlk adım, NE formülasyonudur ve daha sonra ikinci adımda nanoemüljel oluşturmak için bir jelleştirme maddesine dahil edilmesidir (Şekil 2.6). Emülsifikasyon işlemi, yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde özelliklerine ve bunların eklenme sırasına dayanır. HLB'deki sıcaklığa dayalı değişiklikler, Tween 20, Tween 60, Tween 80, Labrasol gibi iyonik olmayan yüzey aktif maddeler için kullanılır. Bu yöntem çoğunlukla faz dönüşümü sırasında faz geçişi için kullanılır. Sürekli karıştırarak soğutma uygulaması, dönüşüm sıcaklığında hazırlanan emülsiyonun tersine çevrilmesine yol açacaktır. Faz dönüşüm sıcaklığındaki azalma, bu teknik kullanılarak termostabil bileşenlerin dahil edilmesini kolaylaştırır. İkinci adım, NE'de sıvı durumu jele dönüştürmek için jelleştirme maddesi içerir. Uygun jelleştirme maddesi, jel bazını hazırlamak için sürekli karıştırılarak damıtılmış su içinde dağıtılır.

Hazırlanan jelin pH'ı ayarlanır, daha sonra NE sistemi, hazırlanan jele belirli bir oranda ve sürekli karıştırılarak yavaş yavaş dahil edilerek nanoemüljel formülasyonu elde edilir.



Şekil 2-6: Nanoemüljel üretim aşamaları (Eid ve ark. 2014).

2.4.4. Nanoemüljelin Karakterizasyonu

Farmasötik ürün, farklı partiler arasında kalite ve tutarlılığı sağlamak için değerlendirilmelidir. Bu testler, ürünün davranışını ve kararlılığını anlamaya yardımcı olur. Topikal bir dozaj formu, su içeriği, mikrobiyal limitler, antimikrobiyal ve antioksidan içerik, pH, partikül boyutu, sterilité gibi vaka bazında USP tarafından belirlenen birkaç spesifik testten geçmelidir: Topikal dozaj formu için gerekli testlerin dışında nanoemüljel, zeta potansiyeli, damlacık boyutu ve PDI açısından değerlendirilmesi gereken nano boyutlu globüllerden oluşur. Bu fizikokimyasal testlerin yanı sıra, bir dozaj formunun in vitro salım açısından değerlendirilmesi gerekir. Nanoemüljelin davranışını anlamak için yayılabilirlik, biyoadezyon testleri, cilt tahrişi, ex-vivo geçirgenlik ve in-vivo biyoyararlanım gerçekleştirilebilir. Bir nanoemüljelin önemli özelliklerini analiz etmek için yöntemler ve teknikler aşağıda kısaca açıklanmıştır (Donthi ve ark., 2023).

2.4.4.1. Zeta Potansiyeli

“Zeta potansiyeli literatürde, dispersiyon içinde dağılan fazı oluşturan yüklü tanecikler ve bunların etrafındaki polar (veya apolar) çözeltinin birbirlerine göre hareketlerinde, çözelti-tanecik arasındaki kayma yüzeyinden ölçülebilen potansiyel olarak tanımlanmıştır” (Özdemir, 2019). Zeta potansiyeli ölçümü, net yükün dolaylı bir ölçümünü sağlar ve partiden partiye tutarlılığı karşılaştırmak için bir araçtır. Zeta potansiyeli ne kadar yüksek olursa, formülasyonun stabilitesinin artmasıyla sonuçlanan itme o kadar büyük olur. Örneğin, emülsiyon globüllerinin yüksek zeta potansiyeli bunların birleşmesini engeller. Yüzey yükünü ayarlamak için bir yüzey yükü değiştiricisi de kullanılabilir. Örneğin, negatif yüklü bir yüzey değiştirici kullanılırsa, zeta-potansiyel değeri negatif olur ve bunun tersi de geçerlidir (Donthi ve ark., 2023).

2.4.4.2. Damlacık Boyutu Ölçümü ve Polidispersite İndeksi (PDI)

Nanoemüljeldeki globülün boyutu, aktif parça ile aynı oranda yayılan eşdeğer sert kürenin çapı olan hidrodinamik çapı olarak adlandırılır. PDI damlacık boyutunun dağılımını belirler ve damlacık boyutunun standart sapması bölü ortalama damlacık boyutu olarak tanımlanır. Damlacık boyutu ve PDI, dozaj formunun ex-vivo ve in-vivo performansının yanı sıra stabilite ve ilaç salımı ile yakından bağlantılıdır. Formülasyonun globül boyutu ve PDI'sı, bir zeta boyutlayıcı veya ana boyutlayıcı kullanılarak ölçülebilir. Emülsiyonun globül boyutu, geçiş difüzyon katsayısının lazer ışını ve dağılım arasındaki etkileşimin yanı sıra PDI'ın izlenmesiyle ölçüldüğü dinamik ışık saçılımı ilkesi kullanılarak belirlenebilir.

2.4.4.3. Reolojik Karakterizasyonlar

Reoloji, malzemelerin deformasyonu ve akışının incelenmesidir. Malzemelerin reolojik karakterizasyonu, yağlar, yüzey aktif maddeler ve jelleştirici maddeler gibi eksipiyan konsantrasyonlarının formülasyonun viskoelastik akış davranışı üzerindeki etkisini ortaya koymaktadır. Bir formülasyonun viskozitesi ve akış özellikleri değişirse, bu durum stabilitesini, ilaç salınımını ve diğer in vivo parametrelerini etkileyebilir. Bu nedenle, reolojik davranış, nanoemüljel formülasyonunda son derece önemli bir faktördür ve reolojik davranışı belirlemek için birkaç benzersiz viskozimetre türü kullanılabilir. FDA, düşük veya yüksek platolar gözlemlenene kadar, mümkün olan her durumda, hem ısı stresine karşı kayma hızına hem de viskoziteye karşı kayma hızına göre çizilen tam akış eğrilerinin değerlendirilmesini önerir (Donthi ve ark., 2023).

2.4.4.4. Doku Profili Analizi

Topikal dozaj formunun yayılabilirlik özelliği, dozaj formunun eşit şekilde yayılmasını sağlar, böylece etkinliği etkileyen zincirli bir doz verir. Nanoemüljin viskozitesi, yayılabilirlik özelliğini büyük ölçüde etkiler. Bugüne kadar, dozaj formunun yayılabilirliğini ölçmek için standart bir yöntem oluşturulmamıştır. Yayılabilirlik, emüljin 'Kayma' ve 'Sürüklenme' nitelikleri ile belirlenir. Nanoemüljel dozaj formu, daha sonra sabit ve hareketli cam slaytlar arasında sıkıştırılan sabit bir cam slayt üzerine yerleştirilir (Pozo ve ark., 2019).

2.4.5. Nanoemüljellerin Kozmetikte Uygulama Alanları

Aktif farmasötik içerik olarak diklofenak dietilamin içeren Voltaren Emüljel, İbuprofen içeren Isofen Emüljel, benzoil peroksit ve biguanid içeren Benzolait Emüljel, diklofenak dietilamin, metil salisilat ve mentol içeren Adwiflam Emüljel, Etorikoksib içeren Nucoxia Emüljel gibi bazı ürünler topikal uygulama için pazarlanan bazı emüljel örnekleridir.

Nanoteknolojinin kozmetikte kullanımı da oldukça yaygındır. Fullerenler, katı-lipid nanoparçacıklar, lipozomlar, nanozomlar, vs. kozmetik endüstrilerinde halihazırda besleyicidir. Ferulik asit nanoemüljel, Harwansh ve ekibi tarafından cildi zararlı UV radyasyonundan korumak için geliştirilmiştir. Ferulik asit, UV radyasyonunu güçlü bir şekilde emer. Ferulik asitin nanoemüljel sistemine dahil edilmesinin UV'ye maruz kalan cilt üzerinde 4 saatten fazla etkili olmasını sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca akne, sivilce, inflamasyon, osteoartrit ve romatoid artrit neden olduğu ağrı ve deri enfeksiyonunun tedavisi için de halihazırda piyasada bulunan emüljel ürünleri Tablo 2.2'de listelenmiştir (Sultana ve ark. 2022; Harwansh ve ark., 2015).

Tablo 2-2: Piyasada bulunan emüljel ürün örnekleri ve görselleri

Sıra	Ürün	İçerik	Üretici Firma
1	Coolnac Jel emüljel	Diklofenakdietilamonyum	Community PharmacyPublic Co Ltd
2	Voltaren emüljel	Diklofenakdietilamonyum	Novartis İlaç
3	Diklobar emüljel	Diklofenak dietil amin	Barakat İlaç

4	Reumadep emüljel	Ashwagandha, mür, arnika, biberiye, nane ve karanfil	Erbozeta
5	Diclone emüljel	Diklofenak Dietilamin ve Diklofenak sodyum	Medpharma
6	Volini GEL	Diklofenakdietilamin	Ranbaxy Laboratories



(<https://www.voltaren.ca/en/products/topical-gels/emulgel-extra-strength/>)

(<https://barakat-pharma.com/product/diclobar/>)

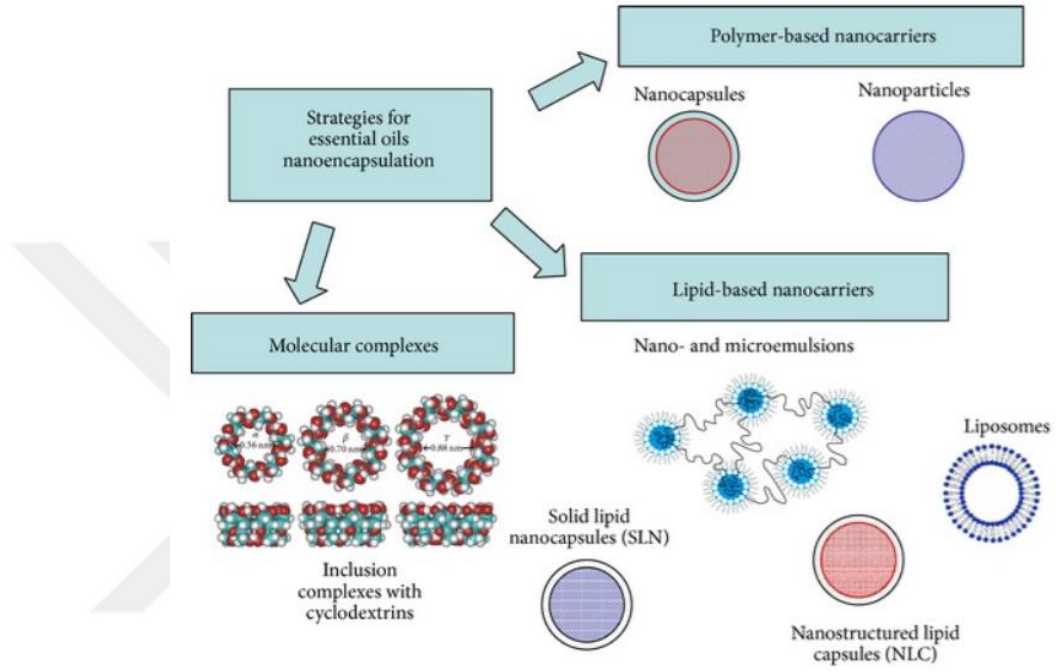
(http://www.pharmasm.com/pdf_files/20170411011405_27_gopal%202_.pdf)

(<https://www.qatarpharmacy.qa/product/reumadep-emulgel-50ml/>)

(<https://pharmeasy.in/health-care/products/volini-joint-xpert-20-gm-gel-3010937/>)

Kozmetik endüstrisinin karşılaştığı problemler arasında mikrobiyal kontaminasyon, formülasyonları olumsuz etkilemesi ve kontrolünün zor olması nedeniyle en önemlilerinden biri olarak öne çıkmaktadır. Bu gibi durumların önüne geçebilmek için formüllerde mikroorganizmaların çoğalmasını önleyen, bu sayede ürünlerin raf ömürlerini artıran çok çeşitli sınıflardaki kimyasal maddeler olan kozmetik koruyucular kullanılmaktadır. Ancak bu koruyucuların bazılarının alerji, tahriş gibi istenmeyen etkileri olabilir ve hatta toksik etkileri olabilir. Bu sorunları azaltmak ve kozmetiklerin doğal ticari cazibesini artırmak amacıyla, kozmetik formülasyonlarda nanokapsüllenmiş esansiyel yağları kullanmak mümkündür. Son araştırmalar, antimikrobiyal özelliklere

sahip nanokapsüllenmiş esansiyel yağların temel araştırmasını ve ayrıca kozmetik amaçlı bu ürünlerin antioksidan potansiyelinin araştırılmasını içermektedir (Albuquerque ve ark., 2022). Şekil 2.7’de uçucu yağlar için nanosistem platformlarının şematik gösterimi bulunmaktadır.



Şekil 2-7: Uçucu yağlar için nanosistem platformlarının şematik gösterimi (Bilia ve ark., 2014).

Ayrıca esansiyel yağların lipozomlarda, katı lipid nanoparçacıklarında, nano- ve mikroemülsiyonlarda ve polimerik nanoparçacıklarda nanokapsüllenmesi, esansiyel yağların sınırlamalarının üstesinden gelmek, dozlarını düşürmek ve bu bileşenlerin uzun vadeli güvenliğini artırmak için umut verici bir stratejiyi temsil eder (Bilia ve ark., 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Kullanılan alet ve malzemeler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan alet ve malzemeler

Tekli ısıtıcılı manyetik karıştırıcı - Wisestir, WisdLaboratoryinstruments
Çalkalamalı su banyosu - WiseBath, WisdLaboratoryinstruments
Mekanik karıştırıcı - Wisestir, WisdLaboratoryinstruments
İklimlendirme kabini - Nüve test cabinet TC120
Ultra saf su cihazı - Elga, PureLabflex
Ultrasonik su banyosu - Wisclean, WisdLaboratoryinstruments
Franz difüzyon hücresi - Çalışkan cam
0,45 mikron selüloz membran-Isolab
Terazi - Mettler PM2000
Hassas terazi - AND GR-200
pH-metre - WTW inolabpH 720
UV Spektrofotometre - Shimadzu UV 1601
Santrifüj cihazı - Sartorius ve Beckman
Ultrasantrifüj cihazı -ThermoScientific
Homojenizatör – IKA
Orbital Çalkalayıcı – ThermoScientific
Malvern Zetasizer Nano ZS

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasallar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasal Maddeler
Transcutol HP- Gattefossé
Melisa (<i>Melisa Officinalis</i>) uçucu yağı – Doalinn marka
Yıldız Anason (<i>Illicium verum</i>) uçucu yağı- Doalinn marka
Kaprilik /Kaprik Trigliserid - Croda
Sensiva PA 30 – Schülke Inc.
DL-alfa tokoferol asetat- Sigma Aldrich
Kolliphor® P 188- Sigma Aldrich
Quillaja saponin (Q-Naturale® 200 V, Ingredion)
Ksantan zımkı (VANZAN® NF-C, Vanderbilt Minerals)

3.2.Yöntemler

3.2.1. Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Tasarlanması

Çalışmamızda ilk olarak melisa ve yıldız anason uçucu yağları kullanılarak Y/S tipi NE formülasyonları hazırlandı. Yağ Fazı:Yüzey etkin madde karışım oranı (YF:S_{mix}); 1:1,5; 1:2; 1:3; oranları olacak şekilde denemeler yapıldı. Formülasyonlar hazırlanırken ultrasonik homojenizatör uygulama süresi göz önüne alınmış olup yapılan farklı denemeler sonucu istenilen damlacık boyutuna sahip olan formüllerle çalışmaya devam edildi.

3.2.1.1. Y/S Tipi Nanoemülsiyon Bileşenlerin Seçimi

Etken Madde Oranının Belirlenmesi: Melisa uçucu yağı ve yıldız anason uçucu yağlarının her biri için % 0,1 olmak üzere çalışmalar yapıldı.

Yüzey etken madde ve yardımcı diğer etken maddelerin türü ve miktarının belirlenmesi: Çalışmalarda Kolliphor® P 188 (surfaktan), Transcutol® HP (kosurfaktan)

ve Q naturale (surfaktan) karışımı (S_{mix}) kullanıldı. Yağ fazı olarak, kaprilik/kaprik trigliserid, antioksidan madde olarak DL-alfa tokoferol asetat, koruyucu olarak ise Sensiva PA 30 kullanıldı.

Karıştırma Hızı ve Süresinin Belirlenmesi: Çalışmalarda yüksek enerji gerektiren ultrasonikasyon yöntemi kullanıldı. F1, F2 ve F3 olmak üzere 3 farklı formülasyon serisi denendi. Ultrasonikatörün band genişliği %50 olarak belirlendi. Ultrasonikasyonun amplitüt ayarı fazla ısınmayı önlemek amaçlı 30 saniye çalışıp 30 saniye duracak şekilde ayarlandı. Bu yöntemle NE'lerin en iyi karıştırma süresinin belirlenmesi için 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, süreleri boyunca ultrasonikasyon uygulandı.

3.2.1.2. Y/S Tipi Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması

Y/S tipi NE'ler aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır:

- Hazırlanacak ürün kozmetik bir nanoemüljel olacağından dolayı bitkisel ve doğal içerikli maddelerin uygun konsantrasyonlarda formülasyon bileşiminde kullanılmasına dikkat edildi.
- Yağ fazını oluşturan melisa uçucu yağı, yıldız anason uçucu yağı, DL-alfa tokoferol asetat, kaprilik/kaprik trigliserid, Sensiva® PA 30, Kosurfaktan (Transcutol HP) ve su fazını oluşturan Kolliphor® P 188, Q naturale ve distile su ayrı beherlerde hassas terazide tartıldı.
- Su fazında yer alan Kolliphor® P 188 ve Q naturale iyice karıştırıldıktan sonra su fazı yağ fazına yavaş yavaş ilave edildi ve formülasyon cam bagetle karıştırıldı.
- Her formülasyon serisi için aynı formülasyon bileşiminden 3 kez hazırlandı ve her örneğe aşağıdaki işlemlerden biri uygulandı:
 1. proses için sonikasyon süresi 5 dak.
 2. proses için sonikasyon süresi 10 dak.
 3. proses için sonikasyon süresi 15 dak.

Tablo 3.3, 3.4, ve 3.5'te ön formülasyon denemelerinde hazırlanan formülasyonların bileşimlerini içeren bilgiler yer almaktadır.

Tablo 3-3: Yağ fazı %5 ve Yağ fazı:Smix = 1:3 olan F1 formülasyonunun bileşimi ve ultrasonikasyon süreleri

(% a/a)	F1P1	F1P2	F1P3
YAĞ FAZI			
Melisa uçucu yağı	0,1	0,1	0,1
Yıldız anason uçucu yağı	0,1	0,1	0,1
DL-alfa tokoferol asetat	0,2	0,2	0,2
Kaprilik/kaprik trigliserid	2,6	2,6	2,6
Sensiva® PA 30	2	2	2
Kosurfaktan (Transcutol HP)	2,50	2,50	2,50
SU FAZI			
Surfaktan (Kolliphor® P 188)	5	5	5
Surfaktan (Q naturale)	7,5	7,5	7,5
Distile su	80	80	80
Ultrasonikasyon süresi	5 dk	10 dk	15 dk

Tablo 3-4: Yağ fazı %7,5 ve Yağ fazı:Smix = 1:2 olan F2 formülasyonunun bileşimi ve ultrasonikasyon süreleri

(% a/a)	F2P1	F2P2	F2P3
YAĞ FAZI			
Melisa uçucu yağı	0,1	0,1	0,1
Yıldız anason uçucu yağı	0,1	0,1	0,1
DL-alfa tokoferol asetat	0,2	0,2	0,2
Kaprilik/kaprik trigliserid	5,1	5,1	5,1
Sensiva® PA 30	2	2	2
Kosurfaktan (Transcutol HP)	2,50	2,50	2,50
SU FAZI			
Surfaktan (Kolliphor® P 188)	5	5	5
Surfaktan (Q naturale)	7,5	7,5	7,5
Distile su	77,5	77,5	77,5
Ultrasonikasyon süresi	5 dk	10 dk	15 dk

Tablo 3-5: Yağ fazı %10 ve Yağ fazı:Smix = 1:1,5 olan F3 formülasyonunun bileşimi ve ultrasonikasyon süreleri

(%a/a)	F3P1	F3P2	F3P3
YAĞ FAZI			
Melisa uçucu yağı	0,1	0,1	0,1
Yıldız anason uçucu yağı	0,1	0,1	0,1
DL-alfa tokoferol asetat	0,2	0,2	0,2
Kaprilik/kaprik trigliserid	7,6	7,6	7,6
Sensiva® PA 30	2	2	2
Kosurfaktan (Transcutol HP)	2,50	2,50	2,50
SU FAZI			
Surfaktan (Kolliphor® P 188)	5	5	5
Surfaktan (Q naturale)	7,5	7,5	7,5
Distile su	75	75	75
Ultrasonikasyon süresi	5 dk	10 dk	15 dk

3.2.2. Nanoemülsiyon Formülasyonları Üzerinde Yürütülen Çalışmalar

Hazırlanan formülasyonlar hızlandırılmış stabilite testleri olarak santrifüj testine ve termal stabilite testine tabii tutuldu. Bu testlerin öncesinde ve testlerin ardından formülasyonların damlacık boyutları, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri alındı ve testlerin öncesi ve sonrası bu parametrelerin değişimleri incelendi.

3.2.2.1. Nanoemülsiyon Santrifüj Testi

Hazırlanan NE'ler ilk olarak "Nüve" santrifüj cihazında 3500 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlendi. Süre sonunda formülasyonlarda faz ayrımı, koalesans, sedimentasyon ve kremalaşma olup olmadığı organoleptik olarak kontrol edildi ve muhtemel stabilite problemleri açısından değerlendirildi. Formülasyonların ayrıca damlacık boyutları, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri alındı. Sonuçta stabilite problemi gösteren formülasyonlar elendi.

3.2.2.2. Nanoemülsiyon Termal Stabilite Testi

Termal test için 40 °C'lik WiseBath® su banyosuna kullanıldı. Sıcaklık her yarım saatte bir 5 °C artırılarak su banyosu 80 °C'ye kadar ısıtıldı. Süre sonunda formülasyonlarda faz ayrımı, koalesans, sedimentasyon ve kremalaşma olup olmadığı organoleptik olarak kontrol edildi ve muhtemel stabilite problemleri açısından

değerlendirildi. Formülasyonların ayrıca damlacık boyutları, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri alındı. Sonuçta stabilite problemi gösteren formülasyonlar elendi.

3.2.2.3. Nanoemülsiyon Damlacık Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyeli Ölçümleri

Çalışılan NE formülasyonlarının damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri için ışık saçılımı prensibine göre çalışan Malvern Zetasizer Nano ZS kullanılarak yürütülmüştür. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 3 ölçümün ortalaması alınmıştır. Formülasyonlar damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri için 1/100 oranında seyreltilmiştir.

3.2.3. Nanoemüljel Formülasyonlarının Hazırlanması

Melisa ve yıldız anason yağı yüklü NE formülasyonları, nanoemüljel formüle etmek için seçildi. Seçilen NE formülasyonları, farklı ksantan zmkı polimer konsantrasyonlarına sahip polimerik jel bazlarına dağıtıldı (örn. %1 %1,5 ve %2 ksantan gum). Melisa ve yıldız anason yağı yüklü NE ve jel bazı 1:1 oranında manyetik karıştırıcı kullanılarak 500 rpm'de 10 dakika boyunca karıştırıldı. Jeller, sıkışan havanın ortadan kaldırılması için 24 saat bekletildi.

3.2.4. Nanoemüljel Formülasyonları Üzerinde Yürütülen Çalışmalar

Hazırlanan formülasyonlar hızlandırılmış stabilite testleri olarak santrifüj testine ve termal stabilite testine tabii tutuldu. Bu testlerin öncesinde ve testlerin ardından formülasyonların damlacık boyutları, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri alındı ve testlerin öncesi ve sonrası bu parametrelerin değişimleri incelendi. Stabilite açısından uygun bulunan nanoemüljeller fizikokimyasal stabilite testlerini yürütmek için taze olarak yeniden hazırlandı.

3.2.4.1. Nanoemüljel Santrifüj Testi

Hazırlanan nanoemüljeller ilk olarak “Nüve” santrifüj cihazında 3500 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüjlendi. Süre sonunda formülasyonlarda faz ayrımı, koalesans, sedimentasyon ve kremalaşma olup olmadığı organoleptik olarak kontrol edildi ve muhtemel stabilite problemleri açısından değerlendirildi. Formülasyonların ayrıca damlacık boyutları, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri alındı. Sonuçta stabilite problemi gösteren formülasyonlar elendi.

3.2.4.2. Nanoemüljel Termal Stabilite Testi

Termal test için 40 °C'lik WiseBath® su banyosuna kullanıldı. Sıcaklık her yarım saatte bir 5 °C artırılarak su banyosu 80 °C'ye kadar ısıtıldı. Süre sonunda formülasyonlarda faz ayrımı, koalesans, sedimentasyon ve kremalaşma olup olmadığı organoleptik olarak kontrol edildi ve muhtemel stabilite problemleri açısından değerlendirildi. Formülasyonların ayrıca damlacık boyutları, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri alındı. Sonuçta stabilite problemi gösteren formülasyonlar elendi.

3.2.4.3. Nanoemüljellerin Fizikokimyasal Stabilite Çalışmaları

Fizikokimyasal stabilite testleri için seçilen nanoemüljel formülasyonları 3 ayrı koşulda (oda sıcaklığı (25 ± 2 °C ve %60 nem), iklimlendirme kabini (40 ± 2 °C ve %75 nem) ve buzdolabında (5 ± 3 °C)) 3 ay boyunca bekletildi ve formülasyonların 1. gün, 1. ay, 2. ay ve 3. ay sonunda organoleptik kontrolleri yapıldı. Ardından formülasyonların pH ve iletkenlik değerleri, viskoziteleri, damlacık boyutları, PDI değerleri ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Tüm deneyler üç defa tekrarlandı.

3.2.4.3.1. Nanoemüljel pH ve İletkenlik Ölçümleri

Nanoemüljellere ait numelerin pH'sı 25 ± 2 °C'de taşınabilir Hanna edge multiparametre cihazı ile seyreltme yapılmadan ölçüldü. Elektriksel iletkenlik değeri de aynı cihazda iletkenlik probu kullanılarak 25 ± 2 °C'de analiz edildi. İletkenlik testi, hazırlanmış olan nanoemüljellerde farklı ortam koşullarına ve zamana bağlı olarak faz değişimi olup olmadığını belirlemek amacıyla yürütüldü.

Hem pH hem de iletkenlik testlerinde, farklı ortam koşullarında bekletilen numunelerin ölçümleri formülasyonlar oda sıcaklığına getirildikten sonra alındı.

3.2.4.3.2. Nanoemüljel Viskozite Ölçümleri

Hazırlanan nanoemüljel formülasyonlarının viskozite ölçümleri Brookfield DV 3T viskozimetre cihazı ile CP40 mili kullanılarak 25 °C'de 10 rpm, 20 rpm, 30 rpm, 40 rpm, 50 rpm, 60 rpm, 70 rpm, 80 rpm, 90 rpm ve 100 rpm kayma hızlarında ölçüldü. Viskozite değerleri 1. gün, 1. ay, 2. ay ve 3. ayda aynı metodla ölçülerek kaydedildi.

3.2.4.3.3. Nanoemüljel Damlacık Boyutu, Zeta Potansiyeli ve Polidispersite İndeksi Ölçümleri

Çalışılan nanoemüljel formülasyonlarının damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri için ışık saçılımı prensibine göre çalışan Malvern Zetasizer Nano ZS kullanılarak yürütülmüştür. Ölçümler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. 3 ölçümün ortalaması alınmıştır. Formülasyonlar damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçümleri için 1/100 oranında seyreltilmiştir. Testler, 1. gün, 1. ay, 2. ay ve 3. ayda aynı metodla ölçülerek kaydedildi.

3.2.4.3.4. Nanoemüljel Doku Profili Analizi (TPA)

Hazırlanan nanoemüljellerin doku profili analizleri, sertlik, sıkıştırılabilirlik, yapışkanlık ve kohezyon gibi mekanik parametreleri belirlemek için CT3 Texture Analyzer (Brookfield, UK) kullanılarak değerlendirildi. 12,7 cm çapında bir analitik prob, ilk sıkıştırmanın sonu ve ikincisinin başlangıcı arasında, tanımlanmış bir geri kazanım süresi (15 s) ile, tanımlanmış bir derinliğe (10 mm), tanımlanmış bir hızda (2 mm/sn) her numuneye iki kez daldırıldı ve 0,01 N'luk bir tetikleme kuvveti uygulandı. Her numunenin üç tekrarlı analizi gerçekleştirildi. Veri toplama ve hesaplama TexturePro CT V1.6 Build ile yapıldı. Ortaya çıkan kuvvet-zaman grafiklerinden, sertlik (belirli bir deformasyonu elde etmek için gereken kuvvet), sıkıştırılabilirlik (probun ilk geçişi sırasında ürünü deforme etmek için gereken iş), yapışkanlık (numunenin yüzeyi ve probun yüzeyi arasındaki çekici kuvvetlerin üstesinden gelmek için gerekli iş) ve kohezyon (ikinci sıkıştırma döngüsünde üretilen kuvvet-zaman eğrisinin altındaki alanın birinci sıkıştırma döngüsünde üretilene oranı) elde edildi (Altuntaş ve Yener., 2017).

3.3. In Vitro Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışma için planlanan in-vitro sitotoksite ve antiviral etkinlik araştırmaları Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışmada virusun çoğaltılması, madde ile yapılan konsantrasyon doz çalışmaları, enfeksiyözite güç tayini gibi gerçekleştirilen in-vitro laboratuvar çalışmalarında kullanılacak olan Yeşil Maymun hücre kültürü (Vero) ile Herpes Simplex-1 (HSV-1) Kos suşu Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı hücre kültürü ve virus koleksiyonundan temin edildi.

3.3.1. Vero Hücre Kültürü ve HSV-1

Vero hücrelerinin üretilmesi ve virus çoğaltma işlemleri, F12 Ham/Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) varlığında 37 °C'de ve %5 CO₂ ihtiva eden inkübatörde gerçekleştirildi. Hücre kültürlerinin hazırlanmasında %10 fetal bovine serum (FBS), %1 antibiyotik ve %1 L-glutamin içeren hücre üretme vasatı (HÜV) kullanıldı. HSV-1'in elde edilmesinde ise %2 FBS, %1 antibiyotik ve %1 L-glutamin içeren virus çoğaltma vasatı (VÇV) kullanıldı.

3.3.2. Çalışılacak Madde

Antiviral çalışmalar ve sitotoksite araştırmalarında kullanılacak olan melisa uçucu yağ ve Yıldız anason uçucu yağı Doalinn adlı bir firmadan temin edilmiştir. Melisa uçucu yağı ve yıldız anason uçucu yağı içeren nanoemüljel formülasyonları hazırlanmış olup yapılan testler sonucunda stabilitesi açısından en uygun bulunan F1P2 kodlu formülasyon antiviral etkinlik testi için seçilmiştir. Antiviral etkinlik testi için % 0.9 oranında uçucu yağ içeren formülasyon için belirlenen kod Tmax, % 0.1 oranında uçucu yağ içeren formülasyon için belirlenen kod Tmin olarak belirlenmiştir.

3.3.3. Konsantrasyon Doz Çalışmaları

Çalışmada kullanılan nanoemüljel formülasyonlarında uçucu yağ bileşenleri iki farklı konsantrasyonda (Tmax, Tmin) olacak şekilde tasarlandı ve bu formülasyonların tasarımında kullanılan ve uçucu yağ içermeyen formülasyon ise Plasebo (P) şeklinde çalışmada ayrıca karşılaştırma amacıyla analiz edildi.

Çalışmada kullanılan formülasyonların hücre kültürü üzerindeki etkileri hem mikroskop altında yapılan görsel değerlendirmeler hem de CCK-8 hücre proliferasyon ve sitotoksite kiti aracılığı ile iki farklı metot ile belirlendi.

3.3.4. T ve P Kodlu Nanoemüljellerin Vero Hücre Kültürü Üzerine Etkilerinin Mikroskop Altında Değerlendirilmesi ve Hücre Canlılığı Üzerine Etki Eden Dozun Yorumlanması

Bu amaç doğrultusunda çalışılan her bir nanoemüljel için 12 kuyucuklu 1 adet hücre kültürü pleyti kullanıldı. Kuyucuklara önceden subkültürleri yapılmış Vero hücre hatlarından $4,5 \times 10^5$ hücre/ml olacak şekilde 500 µl hücre süspansiyonu aktarıldı.

Hücrelerin eksponansiyol üreme fazına geçmesi için pleytler 24 saat 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Hücreler kuyucuk yüzeyini monolayer olarak kapladığında (yaklaşık %80 oranında) hücre üretme vasatı ortamdan uzaklaştırıldı. İncelenen maddelerin her biri (Tmax, Tmin ve P) %2 FBS'li hücre idame vasatı ile 1/500, 1/750, 1/1000, 1/1500 ve 1/2000 olacak şekilde sulandırıldı. Her bir nanoemüljel için hazırlanan sulandırma oranlarından pleytte bulunan kuyucuklara 2 kopya olacak şekilde 500 µl aktarıldı. Sona kalan 2 kuyucuk ise madde ihtiva etmeyen hücre kontrol grubu olarak kullanıldı ve ortama sadece %2 FBS ihtiva eden 500 µl hücre idame vasatı ilave edildi. İşlem sonunda pleytler 48 saat süre ile 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi.

Mikroskop altında yapılan günlük incelemeler ile araştırılan nanoemüljellerin sulandırma oranlarının hücre üzerine etkileri değerlendirildi.

3.3.5. CCK-8 Reaktif Kullanılarak Vero Hücre Kültürü Üzerinde Gerçekleşen Toksik Etkilerin Tespit Edilmesi

Test çalışması üretici firmanın talimatları göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda pleytlerin çalışılacak olan her bir 96 kuyucuğuna tavsiye edilen ml'de ki optimal hücre miktarı olacak şekilde hücre süspansiyonundan 100 µl aktarıldı ve pleytler 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bir gece bekletildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklarda bulunan HÜV uzaklaştırıldı. Pleyt gözlerine hücre vasatı ile 1/500, 1/750, 1/1000, 1/1500, 1/1750 ve 1/2000 dilüsyon oranlarında hazırlanan Tmax, Tmin ve P formülasyonları 3 kopya olacak şekilde 100 µl hacimde kuyucuklara aktarıldı. Kontrol hücrelerinin kuyucuklarına ise madde içermeyen 100 µl hücre vasatı ilave edildi. Ayrıca 3 adet hücre ihtiva etmeyen boş kuyucuğa sadece vasat konuldu ve blank gözleri oluşturuldu. Pleytler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüm kuyucuklara 10 µl CCK-8 reaktif eklendi ve pleytler 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda pleytler test çalışma prosedüründe ifade edilen optik yoğunluğu (OD) 450 nanometre (nm) ve background absorbance 650 nm olan mikropleyt okuyucuda (TecanInfinite F50) okutuldu. Sonuçlar inhibisyon konsantrasyonu (IC) şeklinde değerlendirildi. Çalışma planı Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir. Çalışmalar her bir madde için 3 defa tekrar edildi. Sonuçlar aşağıda ifade edilen formüle göre hesaplandı.

$$IC \% = [(Od\ Kont - Od\ Kont\ Blank) - (Od\ Sample - Od\ Sample\ Blank)] / (Od\ Kont - Od\ Kont\ Blank)$$

Hesaplama sonucunda gözlerden elde edilen değerlerin aritmetik ortalaması alındı ve CurveExpert Professional uygulaması ile sitotoksite eğrileri hesaplandı.

Procedure Details												
Plate Type	96 WELL PLATE											
Read	Absorbance Endpoint											
	Full Plate											
	Wavelengths: 450, 650											
	Read Speed: Normal											
Results												
	Kon:1/500			Kon:1/750			Kon:1/1000			Kon:1/1500		
T _{max}	0,177	0,206	0,229	0,327	0,331	0,295	0,452	0,441	0,521	0,52	0,503	0,53
	0,049	0,05	0,051	0,052	0,053	0,052	0,046	0,046	0,046	0,046	0,045	0,047
T _{min}	0,191	0,206	0,171	0,302	0,312	0,308	0,449	0,488	0,407	0,46	0,45	0,421
	0,043	0,042	0,041	0,043	0,046	0,046	0,046	0,046	0,044	0,045	0,044	0,045
P	0,165	0,161	0,161	0,265	0,263	0,255	0,397	0,43	0,389	0,433	0,442	0,423
	0,04	0,039	0,04	0,043	0,043	0,043	0,047	0,045	0,044	0,044	0,044	0,046
							0,158	0,153	0,151	1,043	1,042	1,063
							0,048	0,047	0,047	0,053	0,047	0,048
							Blank			H.K		

Şekil 3-1: Pleyt çalışma planı örneği. 1/500 – 1/1500 dilüsyonlardaki maddelerin 1. Tekrar absorbance değerleri. H.K: Hücre kontrol grubu.

3.3.6. Antiviral Aktivite Çalışmaları

T_{max}, T_{min} ve P formülasyonlarının HSV-1 üzerindeki antiviral aktivitesi, HSV-1'in %50 uç nokta titresini belirlenerek doku kültürü enfektif dozu (DKID50) Frey ve Liess'in belirlediği yöntemine göre hesaplandı (Frey ve Liess., 1971).

3.3.7. Formülasyonların HSV-1 Üzerinde ki Antiviral Aktivitesi

Formülasyonların antiviral aktiviteleri 96'lık pleytlerde ayrı ayrı çalışıldı. Bu amaç doğrultusunda daha önceden subkültürleri yapılan Vero hücre kültürlerinden 8.0×10^5 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. 96 kuyucuklu pleytler için hazırlanan bu süspansiyondan 100µl olacak şekilde gözlere dağıtıldı ve hücrelerin eksponansiyon üreme fazına geçmesi için 1 gece 37°C %5 CO₂'li inkübatörde bekletildi. Hücreler kuyucuk yüzeyinin yaklaşık %90 oranında monolayer olarak kapladığında hücre üretme vasatı kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Yukarıdan aşağı olacak şekilde 10'a kadar numaralandırılan Pleyt içerisindeki 8 oyuk antiviral madde ihtiva eden ve etmeyen

kuyucuklar olacak şekilde 2'ye ayrıldı. Pleyt yüzeyindeki son 2 sıra kuyucuk hücre ve virus kontrol grubu olarak kullanıldı.

Formülasyon ihtiva eden bölümlere 1/2000 dilüsyon oranında çalışılacak madde içeren hücre vasatından 100'er µl 4 sıra kuyucuk olacak şekilde 10. numaraya kadar konuldu. Aynı şekilde pleytin diğer yarısında ki gözlere antiviral ihtiva etmeyen hücre üretme vasatından 100'er µl ilave edildi. Formülasyonların HSV-1'e karşı olası hücre için bir etkinlik (Virusun replikasyon basamaklarına yönelik herhangi bir blokaj) gösterebilme ihtimalleri göz önüne alınarak hücrelerin maddeleri metabolize etmeleri sağlandı. Bu sebep ile pleytler 4 saat boyunca 37 °C %5'lik CO₂'li inkübatörde bekletildi.

Çalışmada kullanılacak olan formülasyonun hücre dışı etkinlik göstererek virusun zarf yapısı ve adsorbsiyonunda rol oynayan glikoprotein yapılarını deformasyona uğratabilme ihtimaline karşı ayrıca inkübasyon süresinin bitmesinden önce HSV-1 süspansiyonlarına ek bir daha manipülasyon yapıldı. Formülasyonlu göze aktarılacak olan HSV-1 süspansiyonları ayrı ayrı Tmax, Tmin ve P bileşenlerinin 1/2000 dilüsyon değerlerine sahip hücre üretme vasatı ile Log10 tabanında 10⁻¹'den 10⁻¹⁰' a kadar ependorf tüpleri içerisinde seri olarak sulandırıldı. Pleytin herhangi bir madde ile baskı altında olmayan diğer bölümüne aktarılacak olan HSV-1 ise aynı yöntem ile sadece hücre üretme vasatı kullanılarak sulandırması gerçekleştirildi. Seri sulandırılan virus süspansiyonları aynı anda 30 dakika boyunca 37 °C %5'lik CO₂'li inkübatörde bekletildi.

İnkübasyon işlemlerinin sonunda pleyt kuyucuklarındaki madde ile vasat içeriği uzaklaştırıldı. İşlem sonunda Tmax, Tmin ve P ile muamele edilmiş 4 kuyucuk ile herhangi bir madde ile muamele edilmemiş 4 kuyucuğun 10. sulandırma basamağına kadar her bir kuyucukta 100 µl olacak şekilde önceden sulandırılmış olan virus süspansiyonları aktarıldı. Madde ve vasat aktarım işlemleri tamamlandıktan sonra pleytler 37 °C %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Tmax, Tmin ve P ile muamele edilen gözlerdeki HSV-1 inokulasyonunun hücreler üzerinde gerçekleştirdiği sitopatik davranışlar ve herhangi bir madde ile baskı altına alınmayan, sadece HSV-1 dilüsyonları inokule edilen hücreler üzerinde oluşan sitopatik etkiler (CPE) her gün doku kültürü mikroskobu ile kontrol edildi. Test 72 saat sonunda sonlandırıldı. Testin sonlandırılmasıyla Tmax, Tmin ve P ihtiva eden ve etmeyen kuyucuklarda ki HSV-1'in enfektif dozlarının tespiti için virusun %50 uç nokta titresi Frey ve Liess yöntemine göre hesaplandı (Frey ve Liess., 1971). Pleyt çalışma planı Şekil 3.2'de gösterildi.

Sulandırma katsayısı	Bileşenler ile muamele edilen HSV-1 sulandırmaları				Herhangi bir madde ile baskı altında olmayan HSV-1 sulandırmaları			
1	●	●	●	●	●	●	●	●
2	●	●	●	●	●	●	●	●
3	●	●	●	●	●	●	●	●
4	●	●	●	●	●	●	●	●
5	●	●	●	●	●	●	●	●
6	●	●	●	●	●	●	●	●
7	●	●	●	●	●	●	●	●
8	●	●	●	●	●	●	●	●
9	●	●	●	●	●	●	●	●
10	●	●	●	●	●	●	●	●
Test Kontrol grupları								

Şekil 3-2: 96 kuyucuklu hücre kültür pleyti çalışma planı. HSV-1 üzerinde kullanılan bileşenlerin antiviral aktivitesi aynı virus türünün herhangi bir antiviral etkinlik sergilemeyen grupta ki DKID₅₀. Yukarıda gösterilen çalışma planı Tmax, Tmin ve P maddeleri için geçerlidir.

4.BULGULAR

4.1. Nanoemülsiyon Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Bu tez çalışmasında hazırlanan nanoemülsiyonların ön formülasyon bulgularına ait veriler Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Nanoemülsiyon formülasyon çalışmalarına ait karakterizasyon verileri

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
F1P1	297,2	0,399	-43,8
F1P2	168,2	0,123	-39,7
F1P3	226,6	0,190	-43,8
F2P1	175,4	0,198	-39,7
F2P2	200,5	0,186	-41,7
F2P3	225,5	0,199	-41,8
F3P1	162,3	0,141	-38,3
F3P2	263,3	0,205	-41,3
F3P3	245,1	0,205	-42,6

4.1.1. Nanoemülsiyon Santifüj Testine Ait Bulgular

Nanoemülsiyonların santrifüj testine ait ölçüm sonuçları Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4-2: Nanoemülsiyon santrifüj testi ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		PDI		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	ST	1.gün	ST	1.gün	ST
F1P1	297,2	270,7	0,399	0,267	-43,8	-43,6
F1P2	168,2	169,1	0,123	0,143	-39,7	-38,4
F1P3	226,6	228,8	0,190	0,203	-43,8	-42,1
F2P1	175,4	189,1	0,198	0,194	-39,7	-39,7
F2P2	200,5	211,9	0,186	0,195	-41,7	-38,1

F2P3	225,5	224,3	0,199	0,209	-41,8	-41,5
F3P1	162,3	167	0,141	0,160	-38,3	-38,3
F3P2	263,3	246,9	0,205	0,225	-41,3	-44,1
F3P3	245,1	242	0,205	0,201	-42,6	-40

4.1.2. Nanoemülsiyon Termal Stabilite Test Sonuçları

Nanoemülsiyonların termal stabilite testine ait ölçüm sonuçları Tablo 4.3'te, santrifüj ve termal stabilite testlerinin ardından en uygun bulunan nanoemülsiyonlara ait içerik bilgileri ise Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4-3: Nanoemülsiyon termal stabilite testi ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		PDI		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	TST	1.gün	TST	1.gün	TST
F1P1	297,2	278,3	0,399	0,205	-43,8	-42
F1P2	168,2	189,5	0,123	0,122	-39,7	-40,2
F1P3	226,6	238	0,190	0,151	-43,8	-43,7
F2P1	175,4	225,1	0,198	0,157	-39,7	-44,6
F2P2	200,5	290,2	0,186	0,244	-41,7	-45,8
F2P3	225,5	311,4	0,199	0,259	-41,8	-44,2
F3P1	162,3	193	0,141	0,056	-38,3	-41,3
F3P2	263,3	276,5	0,205	0,193	-41,3	-46,3
F3P3	245,1	278,2	0,205	0,184	-42,6	-45

Tablo 4-4: Uzun süreli stabilite çalışmaları için seçilen formülasyon bileşenlerine ait tablo

(%a/a)	F1P2	F3P1
YAĞ FAZI		
Melisa uçucu yağı	0,1	0,1
Yıldız anason uçucu yağı	0,1	0,1
DL-alfa tokoferol asetat	0,2	0,2

Kaprilik/kaprik trigliserid	2,6	7,6
Sensiva® PA 30	2	2
Kosurfaktan (Transcutol HP)	2,50	2,50
SU FAZI		
Surfaktan (Kolliphor® P 188)	5	5
Surfaktan (Q naturale)	7,5	7,5
Distile su	80	75

4.2. F1P2 kodlu Nanoemülgelin Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

F1P2 kodlu nanoemülgel için formülasyon bulguları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4-5: F1P2 kodlu nanoemüljele ait karakterizasyon verileri

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
F1P2(1:1)%1	136,6	0,155	-46,8
F1P2(1:2) %1	180,6	0,281	-59,3
F1P2(1:3) %1	241,1	0,387	-57,4
F1P2(1:1) %1,5	146,4	0,137	-51,8
F1P2(1:2) %1,5	177,7	0,386	-59,1
F1P2(1:3) %1,5	361,7	0,560	-63,5
F1P2(1:1) %2	256,6	0,445	-60,1
F1P2(1:2) %2	299,2	0,409	-59,8
F1P2(1:3) %2	315,6	0,305	-62,6

4.2.1. F1P2 Kodlu Nanoemülgelin Santifüj Testine Ait Bulgular

Nanoemülgel F1P2 için santifüj testine ait bulgular Tablo 4.6'da gösterilmiştir.

Tablo 4-6: F1P2 kodlu nanoemüljin santifüj testine ait ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		PDI		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	ST	1.gün	ST	1.gün	ST
F1P2(1:1) %1	136,6	225,1	0,155	0,296	-46,8	-52,0
F1P2(1:2) %1	180,6	267,1	0,281	0,448	-59,3	-61,6
F1P2(1:3) %1	241,1	245,1	0,387	0,415	-47,4	-62,1
F1P2(1:1)%1,5	146,4	126,9	0,137	0,126	-51,8	-50,4
F1P2(1:2)%1,5	177,7	174,0	0,386	0,302	-59,1	-58,5
F1P2(1:3)%1,5	437,8	263,8	0,560	0,717	-63,5	-66,1
F1P2(1:1) %2	256,6	309,6	0,445	0,485	-60,1	-50,1
F1P2(1:2) %2	299,2	368,8	0,409	0,531	-59,8	-57,5
F1P2(1:3) %2	315,6	337,6	0,305	0,518	-62,6	-61,5

4.2.2. F1P2 Kodlu Nanoemüljin Termal Stabilite Testine Ait Bulgular

Nanoemüljel F1P2 için termal stabilite testine ait bulgular Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4-7: F1P2 kodlu nanoemüljin termal stabilite testine ait ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		PDI		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	TST	1.gün	TST	1.gün	TST
F1P2(1:1) %1	136,6	161,9	0,155	0,201	-46,8	-53,3
F1P2(1:2) %1	180,6	157,4	0,281	0,240	-59,3	-61,9
F1P2(1:3) %1	241,1	218,7	0,387	0,402	-47,4	-60,8
F1P2(1:1)%1,5	146,4	156	0,137	0,282	-51,8	-44,3
F1P2(1:2)%1,5	177,7	147,5	0,386	0,359	-59,1	-56,1
F1P2(1:3)%1,5	437,8	218,5	0,560	1,000	-63,5	-60,8
F1P2(1:1) %2	256,6	281,4	0,445	0,506	-60,1	-52,5
F1P2(1:2) %2	299,2	361,5	0,409	0,525	-59,8	-61,8
F1P2(1:3) %2	315,6	370,9	0,305	0,541	-62,6	-60,2

4.3. F3P1 Kodlu Nanoemüljin Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

F3P1 kodlu nanoemüljel için formülasyon bulguları Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4-8: F3P1 kodlu nanoemüljele ait karakterizasyon verileri

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
F3P1(1:1) %1	133,8	0,227	-41,3
F3P1(1:2) %1	174,8	0,383	-31,0
F3P1(1:3) %1	188,1	0,476	-37,8
F3P1(1:1)%1,5	136,8	0,276	-37,1
F3P1(1:2)%1,5	184,5	0,478	-38,1
F3P1(1:3)%1,5	251,7	0,492	-51,5
F3P1(1:1) %2	135,5	0,382	-28,6
F3P1(1:2) %2	199,0	0,470	-47,5
F3P1(1:3) %2	221,4	0,484	-62,0

4.3.1. Nanoemüljel F3P1 Santifüj Testine Ait Bulgular

Nanoemüljel F3P1 için santifüj testine ait bulgular Tablo 4.9’da gösterilmiştir.

Tablo 4-9: F3P1 kodlu nanoemüljin santifüj testine ait ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		PDI		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	ST	1.gün	ST	1.gün	ST
F3P1(1:1) %1	133,8	118,9	0,227	0,162	-41,3	-44,3
F3P1(1:2) %1	174,8	147,6	0,383	0,378	-31,0	-35,0
F3P1(1:3) %1	188,1	139,1	0,476	0,414	-37,8	-45,3
F3P1(1:1)%1,5	136,8	162,4	0,276	0,363	-37,1	-57,2
F3P1(1:2)%1,5	184,5	186,0	0,478	0,413	-38,1	-61,6
F3P1(1:3)%1,5	251,7	200,2	0,492	0,393	-51,5	-61,4
F3P1(1:1) %2	135,5	171,8	0,382	0,415	-28,6	-61,2
F3P1(1:2) %2	199,0	288,4	0,470	0,511	-47,5	-63,0

F3P1(1:3) %2	221,4	313,4	0,484	0,509	-62,0	-54,4
---------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

4.3.2. F3P1 Kodlu Nanoemülgelin Termal Stabilite Testine Ait Bulgular

Nanoemülgel F3P1 için termal stabilite testine ait bulgular Tablo 4.10’da gösterilmiştir.

Tablo 4-10: F3P1 kodlu nanoemülgelin termal stabilite testine ait ölçüm sonuçları

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı (nm)		PDI		Zeta Potansiyeli (mV)	
	1.gün	TST	1.gün	TST	1.gün	TST
F3P1(1:1) %1	133,8	144,6	0,227	0,146	-41,3	-45,1
F3P1(1:2) %1	174,8	136,2	0,383	0,175	-31,0	-45,0
F3P1(1:3) %1	188,1	151,6	0,476	0,265	-37,8	-32,8
F3P1(1:1)%1,5	136,8	142,3	0,276	0,154	-37,1	-47,1
F3P1(1:2)%1,5	184,5	164,8	0,478	0,292	-38,1	-53,5
F3P1(1:3)%1,5	251,7	202,8	0,492	0,408	-51,5	-58,4
F3P1(1:1) %2	135,5	148,3	0,382	0,180	-28,6	-45,9
F3P1(1:2) %2	199,0	313,1	0,470	0,478	-47,5	-64,4
F3P1(1:3) %2	221,4	308,1	0,484	0,579	-62,0	-61,4

4.4. Doku Profil Analizine (TPA) Ait Sonuçlar

Seçilen nanoemülgelerin doku profil analizi sonuçları Tablo 4.11’de gösterilmiştir.

4-11: Doku Profil Analizi (TPA) sonuçları

Formül kodu	Doku Profil Analizi											
	Sertlik (N)			Sıkıştırılabilirlik (mm)			Adezyon Kuvveti (N)			Koheziflik		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
F1P2 %1	0,08	0,08	0,08	9,66	9,41	9,41	0,05	0,05	0,05	0,69	0,69	1,26
F1P2%1,5	0,08	0,08	0,09	9,39	9,57	8,68	0,05	0,04	0,04	1,50	1,31	1,35
F3P1%1	0,07	0,07	0,07	9,99	9,52	9,86	0,04	0,04	0,03	0,91	1,18	1,25
F3P1%1,5	0,08	0,08	0,09	9,65	9,34	9,5	0,05	0,04	0,04	1,31	0,65	1,32

4.5. Nanoemülgellerin pH Ölçümlerine Ait Bulgular

Fizikokimyasal stabilite testleri kapsamında, seçilen nanoemülgellerin 3 aylık pH ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4-12: Nanoemülgellerin pH ölçümlerine ait bulgular

Formülasyon Kod	pH									
	1. gün	1. ay			2. ay			3. ay		
		5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2
F1P2 %1	4,95	4,94	4,92	4,75	4,86	4,81	4,57	4,88	4,75	4,59
F1P2 %1,5	5,06	5,02	5,02	4,86	5,04	4,92	4,70	5,04	4,90	4,66
F3P1 %1	4,91	4,92	4,90	4,72	4,94	4,83	4,57	4,92	4,78	4,54
F3P1 %1,5	5,04	5,02	5,00	4,84	5,02	4,92	4,65	4,99	4,86	4,62

4.6. Nanoemülgellerin İletkenlik Ölçümlerine Ait Bulgular

Fizikokimyasal stabilite testleri kapsamında, seçilen nanoemülgellerin 3 aylık iletkenlik ölçümlerine ait sonuçlar Tablo 4.13’de verilmiştir.

Tablo 4-13: Nanoemülgellerin iletkenlik ölçümlerine ait bulgular

Formülasyon Kod	İletkenlik (µS)									
	1. gün	1. ay			2. ay			3. ay		
		5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2
F1P2 %1	575,5	562,5	561,0	557,0	564,0	554,5	555,0	565,5	542,0	548,5
F1P2 %1,5	631,5	631,0	630,5	625,0	637,0	628,5	644,5	638,0	632,0	632,5
F3P1 %1	480,0	491,5	498,0	489,5	485,5	489,5	497,5	487,0	484,5	497,5
F3P1 %1,5	618,0	622,0	620,5	619,0	611,5	622,5	614,5	629,0	625,5	619,0

4.7. Nanoemülgellerin Vizkozite Ölçümlerine Ait Bulgular

Fizikokimyasal stabilite testleri kapsamında, seçilen nanoemülgellerin 3 aylık vizkozite ölçüm sonuçları Tablo 4.14-4.17’de verilmiştir.

Tablo 4-14: F1P2 %1 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular

F1P2 %1																				
HIZ (rpm)	1.gün		1. ay						2. ay						3. ay					
			4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	Σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
10	123,28	0,46	121,74	0,95	120,36	0,78	121,00	0,16	120,01	6,94	123,28	2,31	121,97	3,24	121,48	0,74	121,84	0,28	122,28	1,64
20	76,24	1,18	79,14	12,03	85,89	0,69	85,94	0,83	69,16	1,16	76,03	3,01	71,78	1,62	75,92	2,49	76,04	0,85	77,86	1,27
30	51,82	0,64	53,41	0,62	53,08	2,61	55,38	2,16	50,14	2,16	57,23	3,23	52,32	0,00	52,16	3,01	54,86	0,81	55,70	0,95
40	42,46	1,77	43,41	0,11	44,04	2,62	47,36	1,39	40,55	2,08	46,76	2,77	41,37	0,46	39,68	1,75	38,08	1,36	37,34	1,05
50	36,88	0,24	37,74	0,09	35,71	1,11	37,68	0,56	34,47	1,76	40,03	2,41	35,12	0,28	34,68	0,95	35,29	0,31	35,62	0,52
60	32,05	0,30	33,41	0,38	32,10	0,85	35,70	2,85	30,52	1,54	35,76	2,16	30,96	0,30	30,91	0,14	29,20	1,06	28,42	1,79
70	28,83	0,06	29,85	0,99	28,64	1,25	31,40	0,53	27,56	1,46	32,23	1,98	27,75	0,27	28,08	1,10	25,76	1,03	26,22	0,35
80	26,77	0,06	27,96	0,23	27,39	0,24	29,80	0,87	25,30	1,33	29,55	1,91	25,43	0,23	25,12	0,62	23,20	1,02	22,38	0,03
90	25,26	0,05	26,13	0,36	25,93	0,80	26,85	0,47	23,69	1,34	27,58	1,80	23,58	0,16	23,30	0,90	21,01	0,71	20,54	0,42
100	23,91	0,05	24,99	0,46	24,41	0,21	25,64	1,02	22,27	1,24	26,00	1,71	22,04	0,18	21,96	0,59	20,20	0,59	18,88	1,17

$\bar{x}$: 3 ölçümün ortalaması

σ : $\bar{x}$: 3 ölçümün standart sapması

Tablo 4-15: F1P2 %1,5 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular

F1P2 %1,5																				
HIZ (rpm)	1.gün		1. ay						2. ay						3. ay					
			4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
10	196,53	1,39	193,73	2,31	193,71	2,72	193,06	1,64	190,64	1,39	189,01	0,00	189,65	0,83	189,20	3,51	190,88	0,79	190,10	0,48
20	107,11	0,87	107,23	0,69	111,81	1,89	110,21	2,02	107,58	2,77	112,82	1,85	113,94	0,12	107,80	1,64	107,32	0,62	107,56	3,22
30	75,08	0,83	76,22	0,77	76,15	0,95	78,91	0,18	77,83	0,93	81,86	1,39	79,93	0,08	76,07	0,28	75,35	0,13	75,86	1,23
40	68,75	1,50	69,82	0,46	69,03	1,38	70,62	0,90	62,05	0,11	65,08	0,46	66,53	0,28	61,70	0,82	60,48	0,91	58,32	0,23
50	58,99	1,67	59,32	0,28	55,40	0,57	54,58	1,15	52,52	0,28	54,28	0,18	52,93	1,03	54,79	1,45	53,83	1,64	52,49	0,17
60	52,10	1,54	52,76	0,46	48,89	4,86	44,57	0,06	46,22	0,15	47,47	0,23	47,60	0,04	46,80	1,81	46,08	0,28	45,94	0,43
70	47,00	1,59	47,46	0,40	43,73	1,27	42,62	0,05	41,30	0,40	42,28	0,33	42,22	0,01	40,80	0,98	41,72	1,76	42,74	0,55
80	43,25	1,62	43,45	0,52	42,06	1,10	38,90	0,47	37,57	0,40	38,43	0,35	39,51	0,62	38,84	0,79	37,94	0,48	35,52	0,11
90	40,04	1,75	40,22	0,57	39,10	0,93	36,12	0,60	34,77	0,47	35,50	0,25	35,63	0,31	36,18	0,81	36,53	0,29	33,99	0,07
100	37,48	1,58	37,77	0,69	34,34	0,27	32,39	0,28	32,37	0,37	33,00	0,32	32,43	0,02	33,38	0,36	33,47	0,16	190,10	0,48

 $\bar{x}$: 3 ölçümün ortalaması σ : $\bar{x}$: 3 ölçümün standart sapması

Tablo 4-16: F3P1 %1 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular

F3P1 %1																				
HIZ (rpm)	1.gün		1. ay						2. ay						3. ay					
			4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
10	124,10	0,76	123,11	0,98	122,67	0,52	122,38	0,86	120,86	0,19	122,63	1,39	122,10	1,06	122,18	2,06	123,04	3,28	123,72	0,51
20	71,37	1,37	72,11	0,68	72,38	0,15	73,59	0,91	71,34	0,53	71,13	3,01	71,37	1,85	68,92	0,17	69,76	1,36	71,00	1,07
30	52,21	0,16	54,11	0,68	52,57	0,57	53,35	0,64	51,45	2,47	52,76	2,78	55,65	1,24	52,67	0,48	53,63	1,21	56,26	1,04
40	41,94	0,81	45,90	0,35	46,35	0,11	46,02	0,83	41,69	2,55	43,00	2,77	45,24	1,29	42,34	0,76	43,84	0,51	42,70	0,42
50	36,69	0,09	38,59	1,11	37,73	1,22	36,88	1,22	35,71	2,22	36,76	3,33	36,37	4,00	35,58	0,42	35,00	1,22	34,19	1,33
60	33,03	0,31	34,78	0,77	32,21	0,13	32,63	0,48	31,88	2,08	32,76	3,16	33,00	0,31	32,36	0,78	27,77	0,50	28,91	2,18
70	30,13	0,47	31,37	0,76	30,50	0,16	29,87	1,05	28,87	1,98	29,81	3,17	30,16	0,95	28,20	0,40	25,64	0,64	26,96	2,56
80	27,96	0,58	28,94	0,69	28,59	0,72	28,62	0,54	26,65	1,74	27,18	2,83	27,73	0,40	24,50	1,16	25,36	0,68	25,26	0,82
90	26,20	0,26	27,03	0,72	27,43	0,16	27,38	0,95	24,93	1,65	25,18	2,62	24,92	0,36	22,31	1,51	22,89	1,32	22,77	0,92
100	24,53	0,37	25,39	0,01	24,15	0,96	24,15	0,30	23,41	1,57	23,55	2,50	23,70	0,28	21,71	1,66	20,20	0,08	20,96	0,20

 $\bar{x}$: 3 ölçümün ortalaması σ : $\bar{x}$: 3 ölçümün standart sapması

Tablo 4-17: F3P1 %1,5 formülasyonunun viskozite ölçümlerine ait bulgular

F3P1 %1,5																				
HIZ (rpm)	1.gün		1. ay						2. ay						3. ay					
			4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C		4°C		25°C		40°C	
	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	Σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ	$\bar{x}$	σ
10	198,03	1,39	198,45	1,06	197,41	0,22	197,92	0,25	198,49	3,24	197,05	0,93	198,99	0,93	197,64	1,30	196,60	0,62	196,24	1,58
20	111,83	0,00	113,47	0,47	115,00	1,08	117,46	1,02	115,60	5,78	112,10	0,56	112,96	1,31	114,04	3,22	114,48	2,83	116,72	1,58
30	82,84	0,00	83,61	1,08	83,94	0,73	84,74	0,45	84,48	3,85	82,83	0,29	82,96	0,08	85,14	0,43	84,34	0,43	83,30	0,76
40	67,61	0,35	68,26	0,58	66,46	0,36	68,82	2,09	67,04	2,54	66,56	1,17	65,72	0,90	67,92	0,23	67,00	1,19	65,24	0,06
50	57,88	0,28	58,54	0,46	58,34	0,55	57,33	0,88	56,77	1,85	55,73	0,38	55,45	2,10	56,01	1,10	55,02	0,08	53,73	0,87
60	51,12	0,31	51,72	0,38	51,33	0,66	50,31	0,16	49,92	1,39	48,56	0,23	49,00	1,20	50,96	0,68	50,82	0,49	50,84	0,23
70	46,44	0,13	46,72	0,26	45,72	0,87	46,13	0,87	44,52	0,99	43,29	0,36	43,47	0,43	47,01	0,30	46,60	1,97	45,88	0,61
80	42,80	0,06	42,84	0,35	41,53	0,62	43,24	0,47	40,67	0,86	39,54	0,16	38,03	0,16	40,86	0,88	41,08	1,53	43,24	1,41
90	39,75	0,00	39,79	0,26	37,99	0,19	36,69	0,50	37,61	0,67	36,58	0,14	34,79	0,86	37,01	2,44	36,77	0,52	37,81	2,20
100	37,38	0,05	37,47	0,18	35,69	0,23	34,97	0,99	35,09	0,69	34,79	1,10	34,74	0,95	34,19	2,65	32,82	1,27	32,90	0,99

$\bar{x}$: 3 ölçümün ortalaması σ : 3 ölçümün standart sapması

4.8. Fizikokimyasal Stabilité Testinde Damlacık Boyutu, PDI, Zeta Potansiyeli Ölçümlerine Ait Bulgular

Fizikokimyasal stabilité testleri kapsamında, seçilen nanoemülgellerin ilk gün alınan damlacık boyutu, PDI ve zeta potansiyeli ölçüm sonuçlarına ait bulgular Tablo 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4-18: Nanoemülgellerin 1. gün damlacık boyutu, PDI, zeta potansiyeli ölçümlerine ait bulgular (n=3)

Formülasyon Kodu	Ortalama Damlacık Çapı	PDI	Zeta Potansiyeli
F1P2 %1	132,35	0,203	-46,5
F1P2 %1,5	136,15	0,206	-55,8
F3P1 %1	149,5	0,235	-56,7
F3P1 %1,5	176,7	0,294	-61,2

4.8.1. Nanoemülgel Ortalama Damlacık Boyutu 3 Aylık Ölçüm Sonuçları

Fizikokimyasal stabilité testleri kapsamında, seçilen nanoemülgellerin 3 ay boyunca alınan damlacık boyutu ölçüm sonuçlarına ait bulgular Tablo 4.20'de gösterilmiştir.

Tablo 4-19: Nanoemülgellerin 3 aylık Ortalama Damlacık Çapı (nm) bulguları (n=3)

Formülasyon Kod	Ortalama Damlacık Çapı (nm)								
	1. ay			2. ay			3. ay		
	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2
F1P2 %1	127,4	139,05	152,6	117,45	123,865	158,63	114,75	129,15	172,35
F1P2 %1,5	122,3	140,15	178,45	122,78	123,3	192,5	133,7	140,25	211,3
F3P1 %1	143,8	154,05	225,6	133,24	152,495	244,3	153,2	154,55	265,8
F3P1 %1,5	160,85	162,05	229,9	157,83	156,78	250,75	167,75	180,75	285,18

4.8.2. Nanoemüljel 3 Aylık Polidispersite İndeksleri (PdI) Bulguları

Fizikokimyasal stabilite testleri kapsamında, seçilen nanoemüljellerin 3 ay boyunca alınan PdI ölçüm sonuçlarına ait bulgular Tablo 4.21’de gösterilmiştir.

Tablo 4-20: Nanoemüljellerin 3 aylık PdI bulguları (n=3)

Formülasyon Kod	Polidispersite İndeksleri (PdI)								
	1. ay			2. ay			3. ay		
	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2
F1P2 %1	0,161	0,188	0,209	0,168	0,185	0,216	0,172	0,184	0,207
F1P2 %1,5	0,222	0,257	0,263	0,231	0,260	0,276	0,252	0,265	0,290
F3P1 %1	0,144	0,195	0,194	0,151	0,189	0,225	0,149	0,181	0,203
F3P1 %1,5	0,213	0,224	0,200	0,231	0,269	0,275	0,232	0,265	0,277

4.8.3. Nanoemüljel 3 Zeta Potansiyeli (mV) Bulguları

Fizikokimyasal stabilite testleri kapsamında, seçilen nanoemüljellerin 3 ay boyunca alınan zeta potansiyeli ölçüm sonuçlarına ait bulgular Tablo 4.22’de gösterilmiştir.

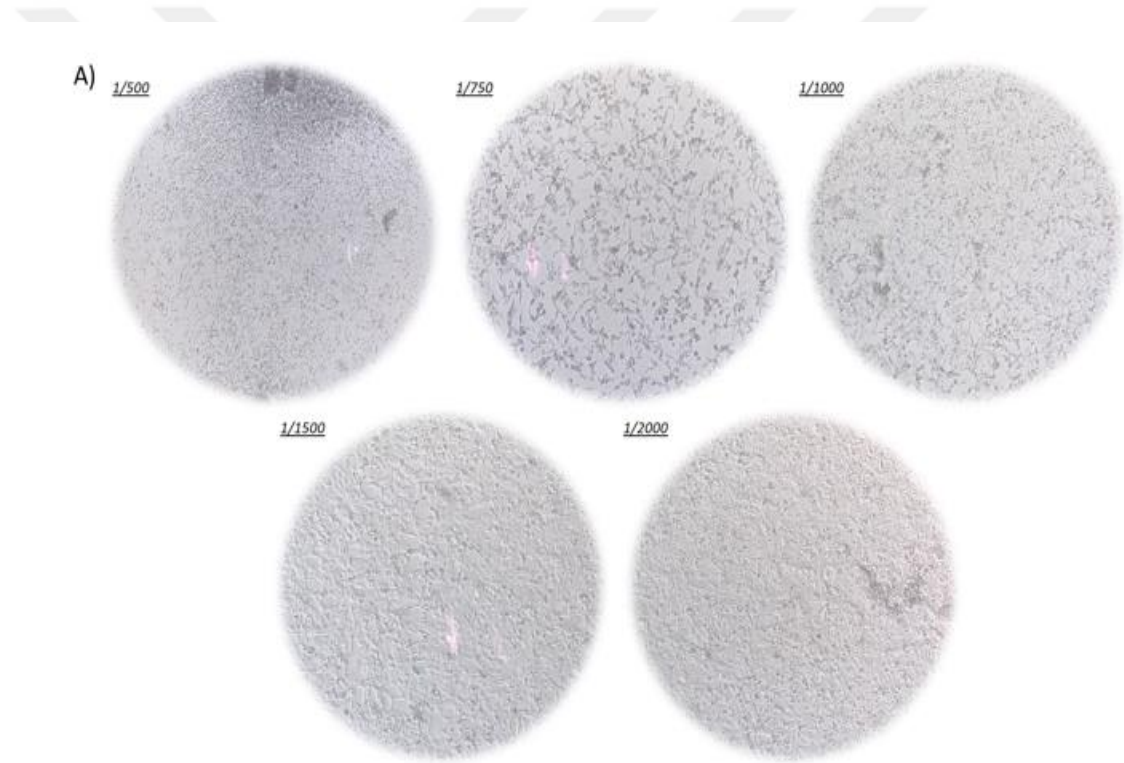
Tablo 4-21: Nanoemüljellerin 3 aylık Zeta Potansiyeli (mV) bulguları (n=3)

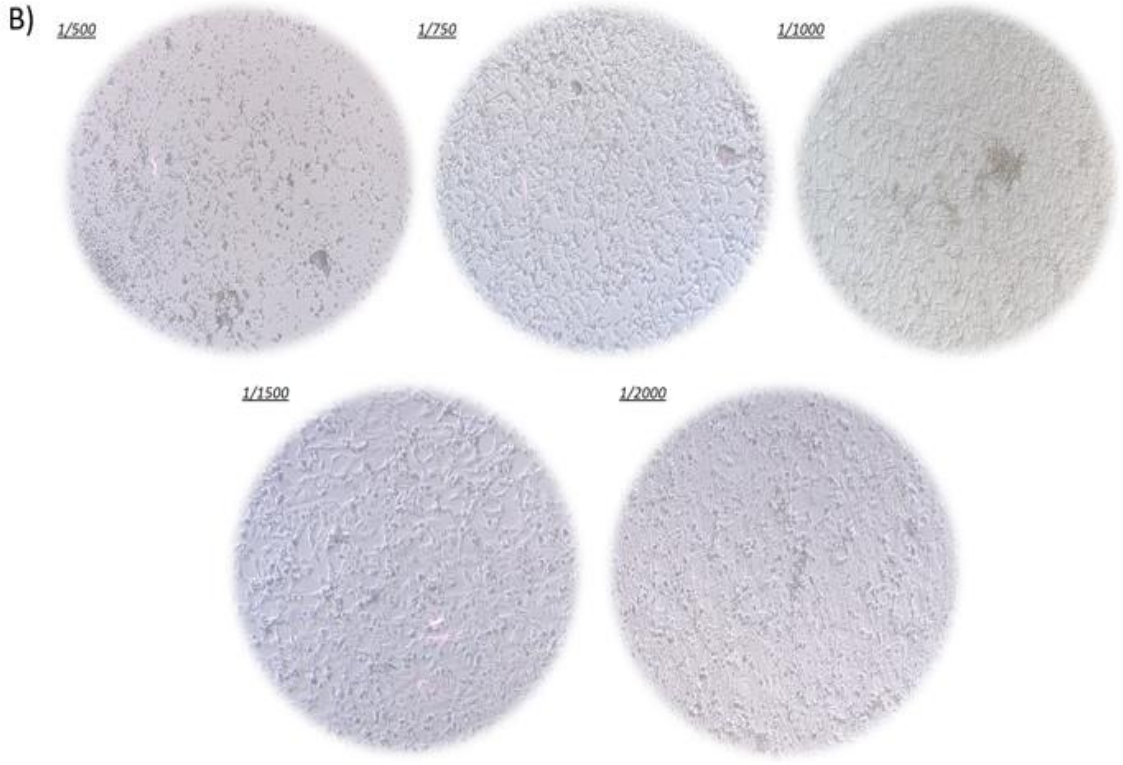
Formülasyon Kod	Zeta Potansiyeli (mV)								
	1. ay			2. ay			3. ay		
	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2	5°C±2	25°C±2	40°C±2
F1P2 %1	-50,3	-47,8	-52,7	-48,3	-46,43	-39,25	-49,7	-53,3	-50,6
F1P2 %1,5	-51	-50,1	-53,3	-55,22	-53,3	-55	-51,8	-53,1	-54,3
F3P1 %1	-50	-53,6	-52,9	-49,55	-48,25	-52,35	-50,4	-54,6	-53
F3P1 %1,5	-64,6	-57,9	-56,1	-55,65	-66,865	-58,65	-56,8	-56,1	-56,1

4.9. In Vitro Hücre Kültürüne Ait Bulgular

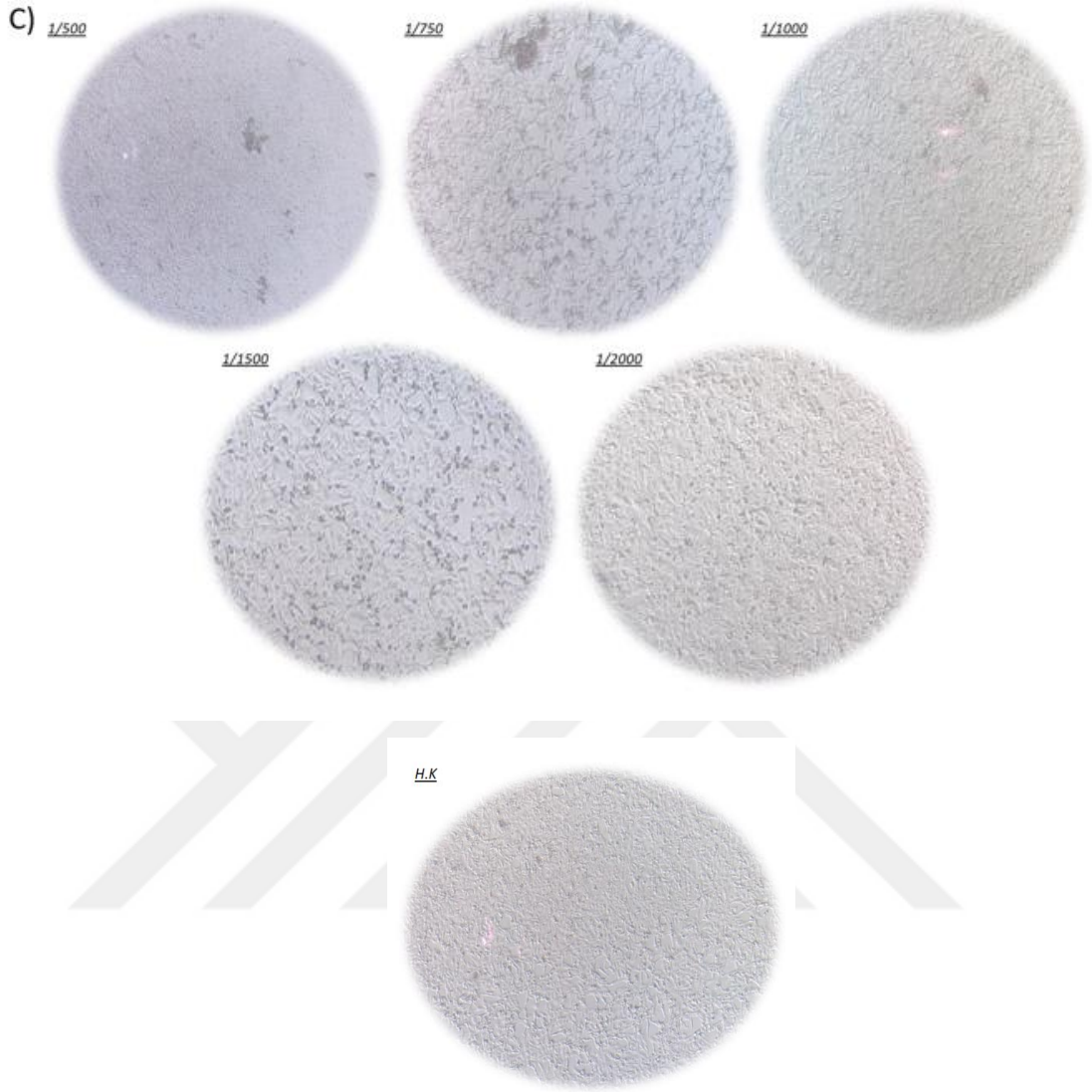
4.9.1. T ve P Bileşenlerinin Vero Hücre Kültürü Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Mikroskop altında yapılan günlük incelemeler ile araştırılan maddelerin, sulandırma oranlarının hücre üzerine etkileri değerlendirmesi sonucunda çalışmada test edilen madde dilüsyonlarının (Tmax, Tmin ve P) hücreler üzerinde öldürücü [Letal doz (LD)] olduğu görülen aralık değerleri hepsinde $1/500 \geq LD_{(n)} > 1/1500$ olarak belirlendi. 1/1500 ve yüksek sulandırmalarda herhangi bir öldürücü etki görülmedi. Görseller Şekil 4.1 ve 4.2’de paylaşıldı.





Şekil 4-1: A) ve B) sırasıyla Tmax ve Tminformülasyonu. Farklı dilüsyonların Vero hücre hattı üzerindeki etkilerinin 48 saat mikroskop görüntüleri (Olympus IX71). 1/1500 ve 1/2000 dilüsyonlarında hücrelerde madde kaynaklı herhangi bir sitopatik etki (CPE) ve ortamda ölü hücre görülmemektedir.



Şekil 4-2: C) Placebo (P). Farklı dilüsyonların Vero hücre hattı üzerindeki etkilerinin 48. Saat mikroskop görüntüleri (Olympus IX71). 1/1500 ve 1/2000 dilüsyonlarında hücrelerde madde kaynaklı herhangi bir sitopatik etki (CPE) ve ortamda ölü hücre görülmemektedir. H.K: Madde ihtiva etmeyen pleyt kuyucuğu.

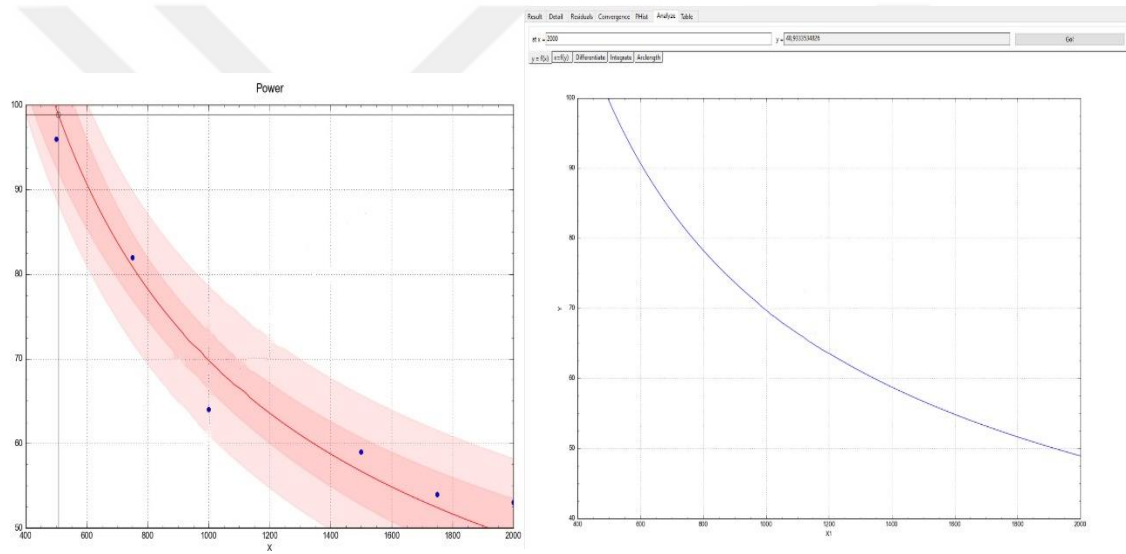
4.9.2. CCK Test Verilerine Ait Bulgular

CCK-8 Test verileri ve inhibisyon konsantrasyon (IC) oranlarını gösteren sonuçlar

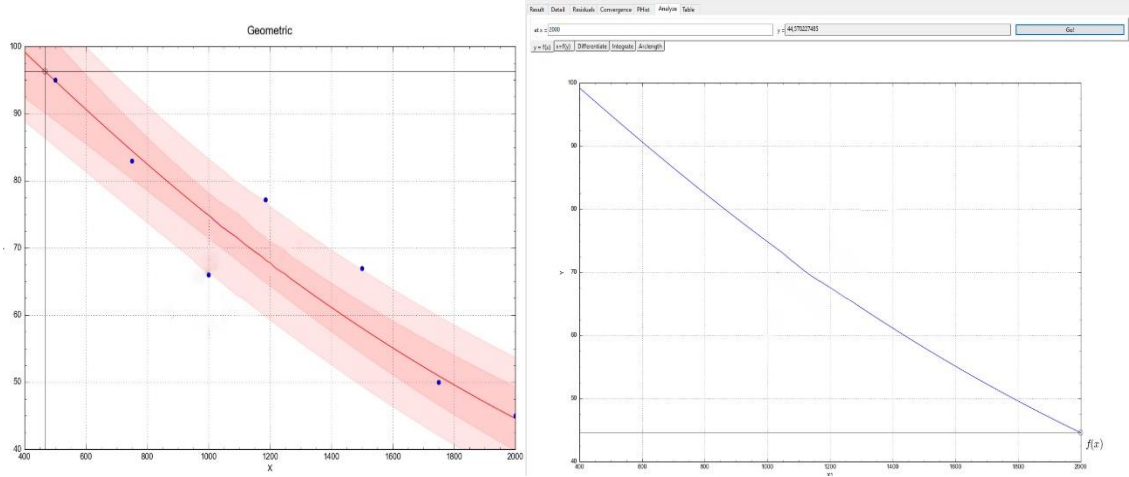
Tablo 4.23’de sitotoksite eğrileri ise Şekil 4.3-4.5’te paylaşıldı.

Tablo 4-22: CCK-8 Test verileri ve inhibisyon konsantrasyon (IC) oranları.

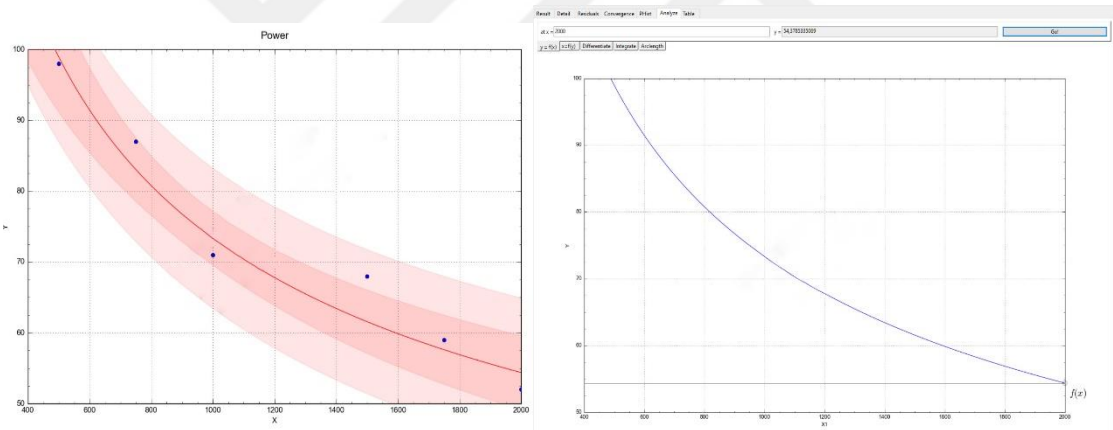
	Madde Dilüsyonları ve Sitotoksite Aritmetik Ortalama(%)					
	1/500	1/750	1/1000	1/1500	1/1750	1/2000
Tmax	94,50%	82,26%	64,44%	59,02%	54,21%	52,92%
Tmin	95,46%	82,66%	66,62%	67,21%	49,68%	45,17%
P	98,23%	87,33%	71,02%	68,48%	59,26%	52,29%



Şekil 4-3: Tmax formülasyonu için veriler girildikten sonra Curve expert professional 2.7.3 uygulamasının önerdiği regresyon eğrileri içerisinde seçilen sitotoksite davranışının “Power regression” modeli (r: 0,991356). Y eksenini IC oranını, X eksenini ise Tmax dilüsyon katsayısı ifade etmektedir. 1/2000 dilüsyon oranı formülasyonda IC48,93 şeklinde bulundu.



Şekil 4-4: Tmin formülasyonu için veriler girildikten sonra Curve expert professional 2.7.3 uygulamasının önerdiği regresyon eğrileri içerisinde seçilen sitotoksite davranışın “Geometric regression” modeli ($r: 0,992046$). Y eksenini IC oranını, X eksenini ise Tmin dilüsyon katsayısı ifade etmektedir. 1/2000 dilüsyon oranı formülasyonda IC44,57 şeklinde bulundu.



Şekil 4-5: P bileşeni için veriler girildikten sonra Curve expert professional 2.7.3 uygulamasının önerdiği regresyon eğrileri içerisinde seçilen sitotoksite davranışın “Power regression” modeli ($r: 0,985506$). Y eksenini IC oranını, X eksenini ise P dilüsyon katsayısı ifade etmektedir. 1/2000 dilüsyon oranı formülasyonda IC_{54,37} şeklinde bulundu.

Yapılan analiz hesaplamaları ve mikroskop altındaki değerlendirmeler sonucunda antiviral çalışma konsantrasyonunun 1/2000 dilüsyonunda olmasına karar verildi.

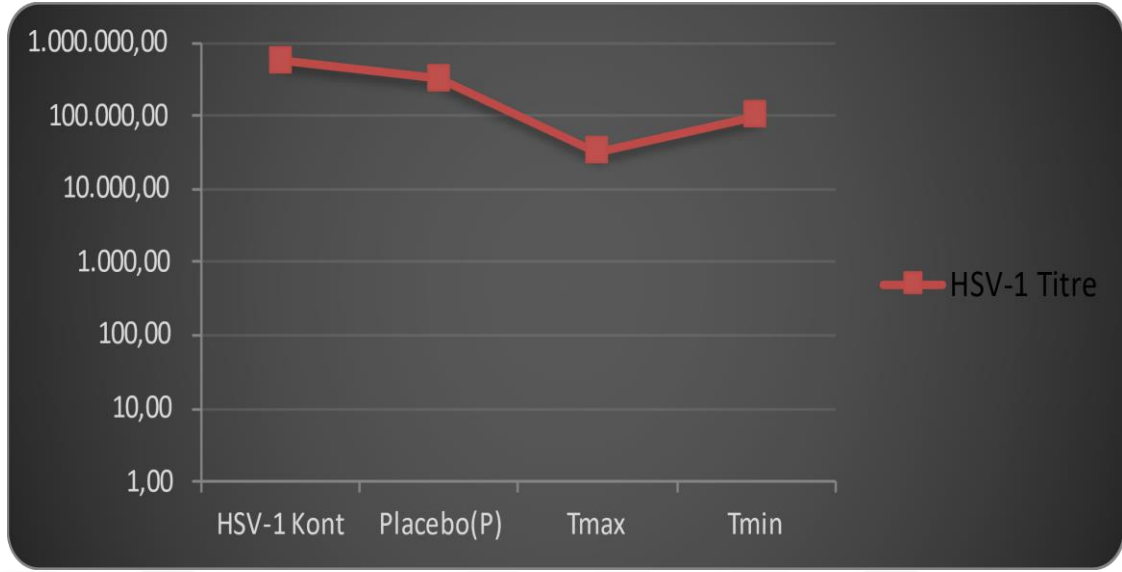
4.9.3. Formülasyonların HSV-1 Üzerindeki Antiviral Aktivitesine Ait Bulgular

Antiviral çalışma için gerçekleştirilen virus titrasyon test sonuçları ve hesaplanan Doku infektif doz 50 (DKID₅₀) değerlerine ait sonuçlar Tablo 4.24'te gösterilmiştir. Bileşenlerin antiviral aktiviteleri değerlendirildi ve mikroskop görüntüleri Şekil 4.7 ve 4.8'de gösterildi. Formülasyonların herhangi bir bileşen ile muamele edilmeyen HSV-1 grubu ile kıyaslamalı antiviral aktivitesine ait logaritmik ölçek grafiği (Log 10) Şekil 4.6'da gösterildi.

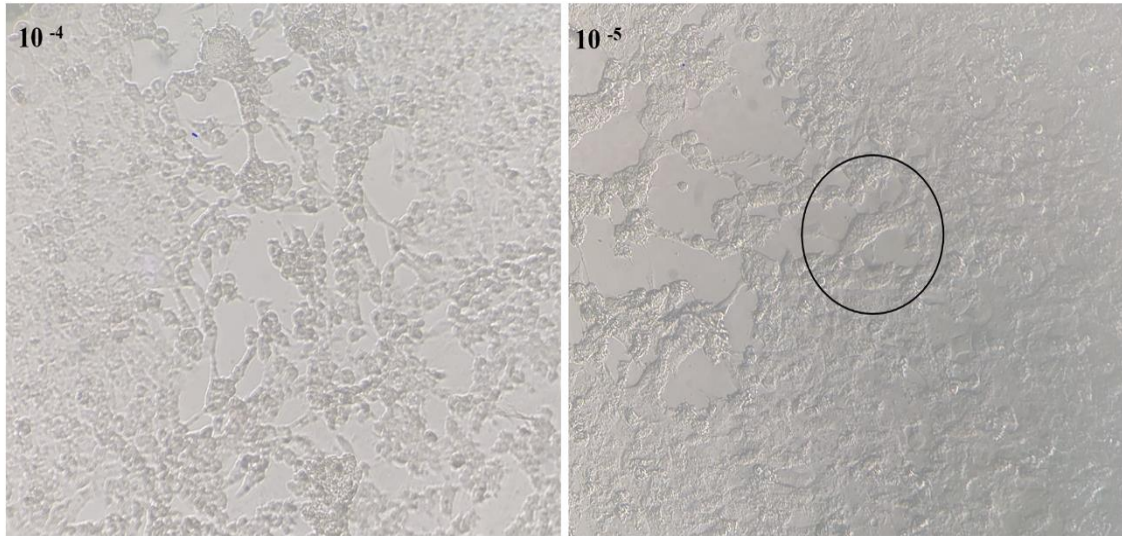
Tablo 4-23: Antiviral çalışma için gerçekleştirilen virus titrasyon test sonuçları ve hesaplanan Doku infektif doz 50 (DKID₅₀) değerleri.

Çalışmada Kullanılan Bileşikler ve HSV-1 Kontrol Grubu	Son CPE Sulandırması	Viral Yük (DKID ₅₀ / ml)
Tmax + HSV-1	4.sulandırma = 4/4	$1 \times 10^{4,5}$
Tmin + HSV-1	4.sulandırma = 4/4 5.sulandırma = 2/4	1×10^5
Plasebo (P) + HSV-1	5.sulandırma = 3/4 6.sulandırma = 1/4	$1 \times 10^{5,5}$
Madde Baskısı Altında Olmayan HSV-1	5.sulandırma = 4/4 6.sulandırma = 1/4	$1 \times 10^{5,75}$

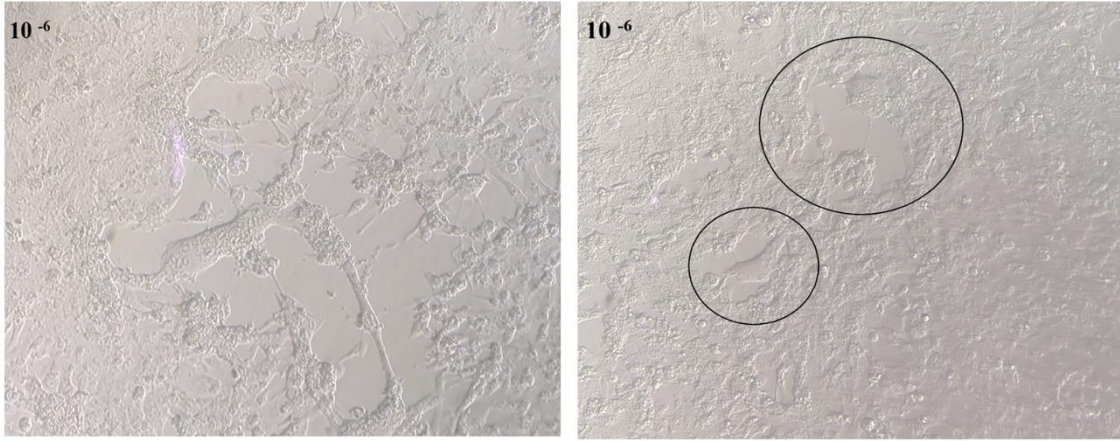
Tablo 4.24'teki verilere göre herhangi bir bileşen ile muamele edilmeyen HSV-1'in viral yüküne kıyasla 1/2000 dilüsyonla Tmax'ın 17,78, Tmin'in 5,62 kat oranlarında virus titresinde azalma sağladığı hesaplandı.



Şekil 4-6: Formülasyonların herhangi bir bileşen ile muamele edilmeyen HSV-1 grubu ile kıyaslamalı antiviral aktivitesi. Grafik logaritmik ölçek (Log 10) kullanımı ile çizilmiştir.



Şekil 4-7: Tmax 10^{-4} son sulandırma gözünde görülen plak ve CPE alanları(x160). Tmin 10^{-5} son sulandırma gözünde görülen plak alanları ve çember içerisinde gösterilen sinsityal hücre formu(x160).



Şekil 4-8: Solda ki resim bileşen ile muamele edilmeyen HSV-1'in titrasyon testinde CPE gösteren son sulandırma katsayısı görüntüsü (x160). Sinsityal hücre formları net bir şekilde görülmektedir. Sağda ki resim Placebo(P) kullanılan HSV-1'in titrasyon testinde CPE gösteren son sulandırma katsayısı görüntüsü. Çember içerisinde gösterilen alanlarda sinsityal hücre formu ve plak oluşumları görülmektedir(x100).

4. TARTIŞMA

Herpes simpleks virüsü (HSV) enfeksiyonları dünya çapında en önemli sağlık sorunlarından birini oluşturmaktadır. HSV-1 neredeyse evrenseldir ve genellikle erken çocukluk döneminde aile ile yakın temastan edinilir. İnsanlardaki en yaygın enfeksiyonlardan biri olup, genel popülasyonun > %70'ini enfekte ettiği bildirilmiştir (Pourchet ve ark., 2017).

Viral hastalıklar farklı yönleri olan kompleks hastalıklardır. Bu nedenle tedavisinde, onunla farklı şekillerde savaşılan ilaçları kullanmak daha etkili olabilmektedir. Mevcut ilaçlar arasında çoklu hedefleme özelliklerinden dolayı bitkisel ilaçlar önerilebilir. Bitkisel ilaçlar bu özelliğe sahip olmasının yanı sıra daha kolay bulunur ve aynı zamanda daha az yan etkiye sahiptir (Behzadi ve ark., 2023).

Uçucu yağlar, çeşitli alanlarda uygulanmalarına yol açan önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Antiviral, antibakteriyel, antifungal, antienflamatuar, kanserojen vb. karakteristik özellikler, çeşitli endüstrilerde insan yaşamı üzerinde büyük etkisi olan faydalı ürünler hazırlamak için kullanılmaktadır. Uçucu yağlarda bulunan aktif bileşikler, güvenli olmayan ilaçlarla değiştirilmek üzere günümüzde kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Farmasötik endüstrilerinde, parfüm ve diğer farmasötik ürünler yapmak için gerekli maddelerin kullanımı popülerlik kazanmaktadır (Nazir ve Gazgoo, 2022). Son yıllarda birçok uçucu yağ antiviral aktivitelere yönelik olarak araştırılmıştır. Reichling ve ark. yaptığı bir çalışmada belirli serbest virüslerin uçucu yağlara karşı çok duyarlı olduğunu bildirmişlerdir (Stephane ve ark., 2020).

Melissa officinalis'in antiviral aktivitelerinin en büyük etkisi HSV tip 1 ve 2 üzerine olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Araştırmacılar, Melissa uçucu yağında bulunan rosmarinik asitin, HSV virüsünün glikoproteinleri (gD ve gB) ile doğrudan etkileşime girdiğini, asiklovire dirençli HSV'nin bağlanmasını ve penetre olmasını engellediğini ve rosmarinik aside ek olarak bu bitkide bulunan kafeik asitin de, HSV'lere karşı antioksidan aktiviteye sahip olduğunu bildirmektedir. Ayrıca, birkaç makalede *Melissa officinalis*'in antioksidan ve antiinflamatuar etkileri kanıtlanmış ve bu bitkinin bir grup viral enfeksiyon için alternatif bir tedavi olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Behzadi ve ark., 2023).

Bir başka çalışmada ise, *Melissa officinalis* esansiyel yağının ana bileşenlerinden olan sitral ve sitronellalin HSV tip-1 ve tip-2'yi güçlü bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiş

olup, bu bileşenlerin *M. officinalis* uçucu yağının antiviral etkisine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Schnitzler ve ark., 2008). İn vitro olarak *M. officinalis* ekstresinin antiherpetik etkiyi göstermekte olduğu ve tekrarlayan herpes enfeksiyonunun topikal tedavisinde geleneksel kullanımını desteklemekte olduğu ifade edilmiştir (Johnson, 2015).

Antiviral aktivitenin in vitro değerlendirmesinin yapıldığı bir başka çalışmada ise yıldız anason, avustralya çay ağacı, kekik ve ökaliptüs'dan elde edilen esansiyel yağlar ile çalışılmış olup, kullanılan uçucu yağların yüksek anti-HSV-1 aktivite sergilediği ve çalışılan uçucu yağlar içinde yıldız anason uçucu yağının 1 µg/mL IC50 değeri ve 160 SI değeriyle en güçlü olduğu bildirilmiştir (Astani ve ark., 2011)

Antiviral etkinin olası mekanizması ise, hücre dışı virüs partiküllerinin inaktivasyonunu, virüsün konakçı hücreye eklenmesinin ve girişinin önlenmesini, viral genomik dizinin replikasyonunun önlenmesini, viral protein sentezinin engellenmesini ve birleşmenin veya salınmanın engellenmesini içerdiği ve yeni enfeksiyöz virionların sayısını azalttığı ve böylece viral enfektivitenin azalmasını sağladığı şeklinde bildirilmektedir (Kerna ve ark., 2021; Andrulewicz-Botulińska ve ark., 2019).

Pek çok bilimsel çalışma, içerdikleri yenilikler ve avantajlardan dolayı nanoteknolojinin kullanımı başta tıp olmak üzere, eczacılık ve kozmetik sektöründe gün geçtikçe artmaktadır.

Nanoemülsiyonlar, 50-1000 nm arasında değişen damlacık boyutu, yağ fazı, su fazı ve sürfaktan/kosürfaktandan oluşan emülsiyon tipi yeni taşıyıcı sistemlerdir. Ortalama parikül boyutu genellikle 100-500 nm arasındadır ve yağ içinde su veya su içinde yağ emülsiyonun su veya yağdan oluşan çekirdeği bulunmaktadır (Lovelyn ve Attama, 2011). Genel olarak tüm nanoemülsiyon formülasyonları etkili, güvenli ve yüksek biyoyararlanımlı olarak kabul edilebilir (Jaiswal ve ark., 2015).

Nanoteknolojinin kozmetikte kullanımı oldukça yaygındır. Fullerenler, katı-lipid nanoparçacık, lipozomlar, nanozomlar, vs. kozmetik endüstrilerinde halihazırda kullanılmaktadır. Hidrofobik ilaçların biyolojik sistemlere verilmesi, düşük çözünürlükleri nedeniyle formülasyon geliştirmede büyük bir zorluk olmuştur ve bu da zayıf biyoyararlanıma yol açmaktadır. Bir nanoemüljin termodinamik kararlılık, geçirgenlik artışı ve sürekli salım gibi üstün özellikleri, onu mükemmel bir dozaj formu

haline getirir. Nanoemüljelin diğer formülasyonlara göre avantajları sayesinde nanoemüljel üretiminde muazzam bir artış öngörülebilir (Donthi ve ark., 2023). Ferulik asitin nanoemüljel formu, Harwansh ve ekibi tarafından cilt hasarını zararlı UV radyasyonundan korumak için geliştirilmiştir. Ferulik asit, UV radyasyonunu güçlü bir şekilde emer. Nanoemüljel sistemine dahil edilmesi ile UV'ye maruz kalan cilt üzerinde 4 saatten fazla etkili olmasını sağladığı bildirilmiştir (Sultana ve ark., 2022; Harwansh ve ark., 2015).

Yapılan literatür incelemesinde HSV-1 tedavisine yardımcı olmaya yönelik yıldız anason (*Illicium verum*) ve Melisa (*Melisa Officinalis*) uçucu yağlarını birlikte içeren nanoemüljel formülasyonlar ile ilgili herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında, HSV-1 üzerinde topikal uygulamaya yönelik yıldız anason (*Illicium verum*) ve Melisa (*Melisa Officinalis*) uçucu yağlarını içeren nanoemüljel formülasyonları geliştirilmiş, karakterizasyon ve stabilite çalışmaları yürütülmüş ve nihai formülasyonların etkinliği araştırılmıştır.

Çalışmamızda formülasyonun yağ fazı melisa uçucu yağı, yıldız anason uçucu yağı, DL-alfa tokoferol asetat, kaprilik/kaprik trigliserid, sensiva® PA 30 ve kosurfaktandan (Transcutol HP), su fazı ise surfaktan (Kolliphor® P 188), surfaktan (Q naturale) ve distile sudan oluşmaktadır.

DL- alfa tokoferol asetat, vitamin E'nin türevlerinden olup en stabil formudur (Keen ve Hassan, 2016). Sensiva PA 30, kozmetik ürünlerde sıklıkla kullanılan yarısı doğal yarısı doğala özdeş olan bir koruyucudur. Transkutol HP ise nanoemülsiyon ve nanoemüljel formülasyonlarda kullanılan iyi bir kosurfaktan ve penetrasyon arttırıcıdır (Osborne & Musakhanian, 2018). Çalışmamızda doğal surfaktan olarak Q-Naturale® tercih edilmiştir. Q-Naturale®, *Quillaja saponaria* Molina ağacının kabuğundan izole edilen, gıdada kullanılabilen doğal bir yüzey aktif maddedir (Yang ve ark., 2013).

Çalışmamıza ilk olarak nanoemülsiyon hazırlama yöntemi olarak yüksek enerji gerektiren ultrasonikasyon yöntemi seçilerek başlanmıştır. Bu yöntemle hazırlanan bazı nanoemülsiyonlarda ön karıştırma yapıldığına dair çalışmalara rastlanmıştır (Hosseini ve ark. 2015). Sonikasyon süresi, yüzey aktif maddenin damlacıkların yüzeyindeki adsorpsiyon hızını ve yeni oluşan damlacıkların boyut dağılımını etkileyebilen işlem parametrelerinden biridir (Li ve Chiang, 2012). Ultrasonikasyon uygulama süresinde değişik zaman aralıklarıyla çalışılmıştır (Ghosh ve ark., 2013; Carpenter ve Saharan.,

2016). Çalışmamızda sonikasyon süresinin ortalama damlacık boyutu, PdI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkisini anlamak için üç farklı sonikasyon süresi (5 dk, 10 dk, 15 dk) denenmiştir. Her formülasyondan 3 örnek hazırlanmış ve 1. formül için sonikasyon süresi 5dk, 2. formül için 10 dk ve 3. formül için sonikasyon süresi 15 dk olacak şekilde uygulanmıştır.

Nanoemülsiyondan nanoemüljele geçiş yapabilmek için jelleştirici bir ajan kullanılır. Formülasyonumuzda bu amaçla fermantasyon işlemiyle üretilen yüksek moleküler ağırlıklı doğal bir polisakkarit olan ksantan zampkı (%1, %1.5, %2) kullanılmıştır.

Yüzey etken madde olarak Kolliphor® P 188 ve Q naturale® denenmiştir. Yardımcı yüzey etken madde olarak ise sadece Transcutol® HP kullanılmıştır. Sürfaktan ve yardımcı sürfaktan oranı 1:1,5 1:2, 1:3 olarak seçilmiştir.

Bu bileşenlerin değişik çalışmalarda kullanıldığı görülmüştür (Fernandez ve ark., 2004; Wulff-Perez ve ark., 2009; Elsheikh ve ark., 2012). Melisa ve Yıldız anason uçucu yağları içeren yağ fazı %5, % 7,5 %10 olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çalışılmıştır. Öncelikle tüm test formülasyonlarına santrifüj testi uygulanmıştır. Santrifüj testini başarıyla geçen formülasyonlar termal stabilite testine tabi tutulmuştur. Santrifüj ve termal stabilite testlerini geçen formülasyonlarda pH değeri, damlacık boyutu, polidispersite indeksi, viskozitesi ölçülmüş ve organoleptik incelemesi yapılmıştır.

Yapılan testler sonucunda stabil kalan formülasyonlar seçilerek fizikokimyasal stabilite testlerine tabi tutulmuştur. 3 ay boyunca, oda sıcaklığında, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %65 R.N., buzdolabında, $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ve iklimlendirme kabininde $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve %75 R.N olmak üzere üç farklı koşulda bekletilen formülasyonlarda belirlenen zaman aralıklarında (1. gün, 1. ay, 2. ay, 3. ay) pH, iletkenlik, viskozite, ortalama damlacık boyutu, PdI değerleri ve zeta potansiyeli analizleri yapıldı. 1.gün ayrıca ve doku profil analizlerine (TPA) bakıldı.

Hızlandırılmış stabilite testleri sonrasında, hazırlanan formülasyonların hiçbirisinde koalesans, kremalaşma ve faz ayrımı gibi kolloidal sistemlerde sıklıkla görülen stabilite problemleri görülmemiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde formülasyonların hızlandırılmış koşullara dahi dayanabildiği sonucuna varıldı.

Fiziokimyasal stabilite testleri sonucunda, 3 farklı sıcaklıkta 3 boyunca stabil kalan saklama koşullarında bekletilen formülasyonların başlangıçta elde edilen fiziksel özelliklerinde bir değişim görülmediği için tüm formülasyonlar organoleptik açıdan stabil olarak değerlendirildi.

pH analizi, stabilitesinin saptanmasında önemli bir parametredir. Nanoemülsiyonlarda oluşabilecek pH değişiklikleri ise formülasyonda kimyasal reaksiyonların oluştuğunun ve ürün kalitesinin azaldığının göstergesidir. Çalışmamızda 3 aylık pH değerlerinde oda sıcaklığı, buzdolabı koşullarında ve iklimlendirme kabiniinde ($40^{\circ}\text{C}\pm 2$, %75 R.N) bekletilen formülasyonların pH değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Ayrıca nanoemülsiyonun dış fazını belirlemek ve stabilizeyi değerlendirmek amacıyla iletkenlik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Y/S nanoemülsiyonların dış fazını su oluşturduğu için bu sistemler yüksek iletkenlik değerlerine sahiptir. S/Y nanoemülsiyonların düşük iletkenlik değeri iç fazın su olmasından kaynaklanmaktadır (Da Costa ve ark. 2014). Elde edilen sonuçlara göre nanoemülsiyonun Y/S tipi olduğu görülmektedir.

Kolloidal sistemlerin stabilitesini değerlendirmede damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyelinde meydana gelen değişimleri saptamakta önemlidir. Bu nedenle 3 ay boyunca formülasyonların ortalama damlacık çapı, PDI ve zeta potansiyeli ölçümleri takip edildi. 3 ay boyunca buzdolabı, oda sıcaklığı ve iklimlendirme kabiniinde bekletilen formülasyonların damlacık boyutlarında değişim meydana gelmemiştir. Çalışmamızda formülasyonların PDI değerlerinin 3 ay boyunca tüm koşullarda 0,3'ün altında kaldığı ve homojen bir damlacık popülasyonuna sahip olduğu saptandı. PDI değerlerinin çoğunlukla 0,3'ün altında bulunması formülasyonların monodispers ve homojen olduğunu kanıtlamaktadır. Bu sonuç, PDI değeri 0,3'ten küçükse nanoemülsiyonların tek dağılımlı bir sistem olarak kabul edildiği literatürle tamamen uyumludur (Pongustan ve ark., 2020).

Zeta potansiyeli, kolloidal dispersiyonların stabilitesinden sorumlu bir parameterde olup dispersiyondaki benzer yüklü partiküllerin birbirini itme derecesini ifade eder. Zeta potansiyelinde tespit edilecek bir azalma formülasyonun flokülasyona daha fazla yatkın olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda formülasyonların 3 ayın sonunda dahi zeta potansiyellerinin yüksek olduğu ve istenen kriterlere uygun olduğu görüldü ($< -20 \text{ mV}$, $> +20 \text{ mV}$).

Vizkozite ölçümü de formülasyonların stabilize değerlendirilmesinde diğer bir önemli parametredir. 3 ay boyunca yapılan ölçümler sonucunda tüm formülasyonlarda önemli bir viskozite değişimine rastlanmamıştır.

Bütün veriler değerlendirildiğinde melisa uçucu yağı ve yıldız anason uçucu yağı içeren F1P2 (1:1) kodlu formülasyonun hem stabilize ve hem de etkinlik açısından en iyi

sonucu verdiği saptanmış olup antiviral etkinlik çalışması için seçilmiştir. Uçucu yağ oranları % 0.9 olarak hazırlanan formülasyon kodu Tmax, uçucu yağ oranları % 0.1 olarak hazırlanan formülasyon kodu Tmin olarak belirlenmiş ve antiviral etkinlikleri araştırılmıştır.

Çalışma için planlanan in-vitro sitotoksite ve antiviral etkinlik araştırmalarında virusun çoğaltılması, madde ile yapılan konsantrasyon doz çalışmaları, enfeksiyözite güç tayini gibi gerçekleştirilen in-vitro laboratuvar çalışmalarında kullanılacak olan Yeşil Maymun hücre kültürü (Vero) ile Herpes Simplex-1 (HSV-1) Kos suşu kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan maddelerin hücre kültürü üzerindeki etkileri hem mikroskop altında yapılan görsel değerlendirmeler hem de CCK-8 hücre proliferasyon ve sitotoksite kiti aracılığı ile iki farklı metot ile belirlenmiştir. Sonuçlar inhibisyon konsantrasyonu (IC) şeklinde değerlendirilmiştir.

Çalışmada test edilen madde dilüsyonlarının (Tmax, Tmin ve P) hücreler üzerinde öldürücü [Letal doz (LD)] olduğu görülen aralık değerleri hepsinde $1/500 \geq LD_{(n)} > 1/1500$ olarak belirlendi. 1/1500 ve yüksek sulandırmalarda herhangi bir öldürücü etki görülmedi. Tmax, Tmin ve P formülasyonlarının farklı dilüsyonların Vero hücre hattı üzerindeki etkilerinin 48 saat mikroskop görüntüleri 1/1500 ve 1/2000 dilüsyonlarında hücrelerde madde kaynaklı herhangi bir sitopatik etki (CPE) ve ortamda ölü hücre görülmemiştir.

Yapılan analiz hesaplamaları ve mikroskop altındaki değerlendirmeler sonucunda antiviral çalışma konsantrasyonunun **1/2000** dilüsyonunda olmasına karar verildi.

IC50: İnhibitör konsantrasyon 50 değeridir. Antiviral çalışmalarda ortamdaki viral yükün %50'sini (1/2) azaltan/baskılayan madde miktarını ifade eder. CC50: sitotoksik konsantrasyon 50 değeridir. Sitotoksite çalışmalarında hücre proliferasyonunu ½ oranında baskılayan madde miktarını ifade eder.

IS (selective index): CC50/IC50 değeridir. İdeal ilacın toksik konsantrasyonu nispeten yüksek ancak aktif konsantrasyonu çok düşük olmalıdır. FDA tarafından onaylı ilaçlarda oranı genellikle 100 ve üzeridir. Ancak çalışmadan çalışmaya IS önerileri değişebilir (Örn olarak kanser araştırmalarında 3 ve üstü dikkate değer olarak önerilir). 1'den küçük olamamalıdır.

Virus inhibisyon oranının hesaplanması formül ($\% \text{ inhibisyon} = [(V_0 - V_t) / V_0] \times 100$) uygulanarak yapıldı.

1/2000 dilüsyon oranlarında $T_{max} = \%94,37$ (17,78 katlık bir azalma) 1/2000 dilüsyon oranlarında, $T_{min} = \%82,21$ (5,62 kat oranlarında bir virus titresinde azalma) olacak şekilde antiviral etkinlik görülmüştür. Ortalama viral titre değerindeki düşüğe bağlı olarak virusun enfektivite gücünün yukarıda ifade edilen oranlarda azaldığı görülmektedir.

Literatürde uçucu yağların antiviral etkinlikleri gösteren çalışmalar değerlendirildiğinde;

Avustralya çay ağacı yağı (TTO) ve okaliptüs yağının (EUO) herpes simpleks virüsüne karşı antiviral etkisinin incelendiği bir çalışmada, Avustralya çay ağacı yağının, viral süspansiyon testlerinde HSV-1 ve HSV-2'ye karşı yüksek düzeyde virüs öldürücü aktivite sergilediği, TTO'nun ise sitotoksik olmayan konsantrasyonlarında plak oluşumu HSV-1 ve HSV-2 için sırasıyla % 98,2 ve %93,0 oranında azalttığı, EUO'nun sitotoksik olmayan konsantrasyonları virüs titrelerini HSV-1 için %57,9 ve HSV-2 için %75,4 azalttığı bildirilmiştir (Schnitzler ve ark., 2001).

Yıldız anason esansiyel yağı ve farklı esansiyel yağlardan seçilmiş bazı bileşenlerin HSV-1'e karşı potansiyel antiviral etkisi in vitro olarak belirlendiği bir başka çalışmada ise plak azaltma analizlerinde yıldız anason yağı ve bileşikleri konsantrasyona bağlı bir antiviral etki sergilediği; test edilen bileşiklerden yalnızca trans-anethole, p - karyofilen ve farnesolun maksimum sitotoksik olmayan konsantrasyonunda herpesvirüs enfektivitesini $>\%90$ oranında baskıladığı bildirilmiştir (Astani ve ark., 2011).

Sivropoulou ve ark (1997) yapmış olduğu bir çalışma da ise anadolu adaçayının (*Salvia fruticosa*) uçucu yağı kullanılarak HSV-1'in ön muamelesi sırasında yüksek seviyede virüsidal aktivite tespit edildiği bildirilmiştir (Sivropoulou ve ark., 1197).

Yıldız anason, mercanköşk otu, kekik, zencefil, papatya ve sandal ağacından elde edilen uçucu yağların herpes simpleks virüsü tip 2'ye (HSV-2) karşı önleyici etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, uçucu yağların sitotoksik olmayan konsantrasyonlarında, HSV-2'nin çördük yağı, kekik yağı veya zencefil yağı ile önceden inkübe edildiğinde plak oluşumu $\%90$ 'dan fazla önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca yıldız anason, mercanköşk otu, kekik, zencefil, papatya ve sandal ağacından elde edilen uçucu yağların adsorpsiyon döneminden önce virüsü etkilediği gösterilmektedir. HSV'nin enfeksiyondan önce uçucu yağlarla ön işleme tabi tutulması, enfektivitede papatya yağı için yaklaşık $\%65$ 'ten mercanköşk otu yağı, kekik yağı ve zencefil yağı için $>\%90$ 'a kadar değişen oranlarda önemli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle papatya uçucu

yağının yüksek bir seçicilik indeksi sergileyerek herpes genitalis tedavisinde virüsidal ajanlar olarak topikal terapötik uygulama için umut verici bir aday olduğu bildirilmiştir (Koch ve ark., 2008)

Nane (*Mentha piperita*) uçucu yağının herpes simpleks virüsüne karşı virüsidal etkisinin incelendiği bir çalışmada ise viral süspansiyon testlerinde HSV-1 ve HSV-2'ye karşı yüksek düzeyde virüs öldürücü aktivite sergilediği ve yağın sitotoksik olmayan konsantrasyonlarında plak oluşumu HSV-1 ve HSV-2 için sırasıyla %82 ve %92 oranında önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. Nane yağı aynı zamanda asiklovire dirençli HSV-1 (HSV-1-ACV) türüne karşı da aktiftir^{res}), plak oluşumu %99 oranında önemli ölçüde azaldığı da bildirilmiştir (Schuhmacher ve ark., 2003).

MDCK hücreleri ve bir CPE tahlili kullanarak 63 bitki uçucu yağının anti-influenza (IFV-A/WS/33) özellikleri açısından araştırdığı bir çalışmada ise en aktif uçucu yağların anason yağı, mercanköşk yağı ve misk adaçayı uçucu yağları olduğu ve 100,0 µg/mL'lik bir konsantrasyonda herhangi bir sitotoksik yan etki olmaksızın %53,0'den fazla CPE azalması ile bir anti-IFV-A etkisi sergilediği bildirilmiştir (Reichling, J. (2021; Choi, H. J. (2018).

Defne (*Laurus nobilis*) ve ardıç (*Juniperus oxycedrus ssp.*) uçucu yağlarının HSV-1 ve SARS-CoV replikasyonuna karşı in vitro inhibitör aktiviteleri açısından değerlendirildiği bir çalışmada ardıç (*Juniperus oxycedrus ssp.*) uçucu yağlarının 200 µg/ml'lik bir IC50 değeri ve 5'lik bir SI ile HSV-1'e karşı antiviral aktivite ortaya gösterdiği bildirilmiştir (Loizzo ve ark., 2008).

12 esansiyel yağın herpes simpleks virüsü tip-1 (HSV-1) replikasyonu üzerindeki antiviral etkisi in vitro olarak incelendiği bir çalışmada limon tuuçuğu yağının %0,1 konsantrasyonda bile viral replikasyonu tamamen engellediği ve antiviral aktivitesinin uçucu yağın konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (Minami ve ark., 2003).

Yaptığımız çalışmada antiviral etkinliği gösteren miktar 1/2000 dir ve IC50 değerinden daha fazla antiviral etkinlik sergilemektedir. Tmax formülasyonumuz için inhibitör konsantrasyon 50 (IC50) değeri %94,37 olarak tespit edilmesi ile literatürde pek çok çalışma ile uyumlu kabul edilebilir.

Ancak çalışmada kullanılan formülasyonların kullanım yolları HSV-1 enfekte doku üzerine topikal yoldan muamele olacak şekilde tasarlanmıştır. Topikal yolla uygulanacak bir bileşenin daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilmesi muhtemeldir.

1/2000 dilüsyon değerlerinde antiviral aktivite oranları in-vivo çalışmalarda daha yüksek konsantrasyon aralıklarında kullanılabilir. Konsantrasyonun yükselmesi antiviral aktivitenin artırması beklenir.

Bu araştırmada incelenen uçucu yağ formülasyonun HSV-1 üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğu ve dolayısıyla anti-HSV-1 olarak kullanılabileceği sonucuna varılabilir.



KAYNAKLAR

- Ahuja A, Ali J, Baboota S, Faisal MS, Shakeell F, Shafiq S (2008) Stability evaluation of Celecoxib nanoemulsion containing Tween 80. *Thai J Pharm Sci* 32:4–9
- Albuquerque, P. M., Azevedo, S. G., de Andrade, C. P., D'Ambros, N. C. D. S., Pérez, M. T. M., & Manzato, L. (2022). Biotechnological Applications of Nanoencapsulated Essential Oils: A Review. *Polymers*, 14(24), 5495.
- Alexander, A., Khichariya, A., Gupta, S., Patel, R. J., Giri, T. K., & Tripathi, D. K. (2013). Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. *Journal of Controlled Release*, 171(2), 122-132.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M. E. N. Ş. U. R. E., & Koltas, S. (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. *Phytomedicine*, 11(7-8), 657-661.
- Altuntaş, E., & Yener, G. (2017). Formulation and evaluation of thermoreversible in situ nasal gels containing mometasone furoate for allergic rhinitis. *AAPS PharmSciTech*, 18, 2673-2682.
- Andrulewicz-Botulińska, E., Kuźmicz, I., Nazaruk, J., Wosek, J., & Galicka, A. (2019). The concentration-dependent effect of anethole on collagen, MMP-2 and GAG in human skin fibroblast cultures. *Advances in Medical Sciences*, 64(1), 111-116.
- Anton N, Benoit JP, Saulnier P (2008) Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-a review. *J Control Release* 128:185–199
- Arduino, P. G., Alovisi, M., & Petti, S. (2023). Herpes simplex virus type 1 in periapical pathoses: Systematic review and meta-analysis. *Oral Diseases*.
- Ashaolu, T. J. (2021). Nanoemulsions for health, food, and cosmetics: a review. *Environmental chemistry letters*, 19(4), 3381-3395.

- Astani, A., Heidary Navid, M., & Schnitzler, P. (2014). Attachment and penetration of acyclovir-resistant herpes simplex virus are inhibited by *Melissa officinalis* extract. *Phytotherapy Research*, 28(10), 1547-1552.
- Astani, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2011). Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011.
- Asua JM (2002) Miniemulsion polymerization. *Prog Polym Sci* 27:1283–1346 Bağdat, R. B., & Coşge, B. (2006). The essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), its components and using fields. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(1), 116-121.
- Banker GS, Lieberman HA, Rieger MM (2002) Pharmaceutical dosage forms. *Disperse Syst Marcel Dekker* 2(3):339–340
- Behzadi, A., Imani, S., Deravi, N., Mohammad Taheri, Z., Mohammadian, F., Moraveji, Z., ... & Behfarnia, P. (2023). Antiviral Potential of *Melissa officinalis* L.: A Literature Review. *Nutrition and metabolic insights*, 16, 11786388221146683.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M. C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2014.
- Carpenter, J. ve Saharan V.K. (2016). Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 422-430
- Choi, H. J. (2018). Chemical constituents of essential oils possessing anti-influenza A/WS/33 virus activity. *Osong public health and research perspectives*, 9(6), 348.

- Crumpacker, C. S., Schnipper, L. E., Marlowe, S. I., Kowalsky, P. N., Hershey, B. J., & Levin, M. J. (1982). Resistance to antiviral drugs of herpes simplex virus isolated from a patient treated with acyclovir. *New England Journal of Medicine*, 306(6), 343-346.
- Da Costa, S., Basri, M., Shamsudin, N. ve Basri H. (2014). Stability of Positively Charged Nanoemulsion Formulation Containing Steroidal Drug for Effective Transdermal Application. *Journal of Chemistry*, 2014(2014), 1-8
- Demir, T., & Akpınar, Ö. (2021). Fitokimyasalların Antiviral Etkileri. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(4), 1519-1535.
- Donthi, M. R., Munnangi, S. R., Krishna, K. V., Saha, R. N., Singhvi, G., & Dubey, S. K. (2023). Nanoemulgel: A Novel Nano Carrier as a Tool for Topical Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 15(1), 164.
- Eid, A. M., El-Enshasy, H. A., Aziz, R., & Elmarzugi, N. A. (2014). Preparation, characterization and anti-inflammatory activity of *Swietenia macrophylla* nanoemulgel. *J Nanomed Nanotechnol*, 5(2), 1-10.
- El-Aasser MS, Lack CD, Vanderhoff JW, Fowkes FM (1986) Miniemulsification process-different form of spontaneous emulsification. *Coll Surf* 29:103–118
- Elsheikh, M.A., Elnaggar, Y.S.R., Gohar, E.Y. ve Abdallah O.Y. (2012). Nanoemulsion liquid preconcentrates for raloxifene hydrochloride: optimization and in vivo appraisal. *Int J Nanomedicine*, 7, 3787–3802.
- Fernandez, P., Andre, V., Rieger, J. ve Kühnle A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 251, 53-58.

- Frey HR., Liess B., 1971. Vermehrungskinetik und verwendbarkeit eines stark zytopatogenen VDMD-Virusstammes für diagnostische untersuchungen mit der Mikrotiter-Methode. Zbl. Vet. Med., 18, 61-
- Gannu, R., Palem, C. R., Yamsani, V. V., Yamsani, S. K., & Yamsani, M. R. (2010). Enhanced bioavailability of lacidipine via microemulsion based transdermal gels: formulation optimization, ex vivo and in vivo characterization. International journal of pharmaceutics, 388(1-2), 231-241.
- Ghosh, S., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2012). Production of shikimic acid. Biotechnology advances, 30(6), 1425-
- Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A. ve Chandrasekaran, N. (2013). Cinnamon Oil Nanoemulsion Formulation by Ultrasonic Emulsification: Investigation of Its Bactericidal Activity. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 13, 114–122.
- Guglielmini, G. (2008). Nanostructured novel carrier for topical application. Clinics in dermatology, 26(4), 341-346.
- Harwansh, R. K., Mukherjee, P. K., Bahadur, S., & Biswas, R. (2015). Enhanced permeability of ferulic acid loaded nanoemulsion based gel through skin against UVA mediated oxidative stress. Life sciences, 141, 202-211.
- Harwansh, R. K., Deshmukh, R., & Rahman, M. A. (2019). Nanoemulsion: Promising nanocarrier system for delivery of herbal bioactives. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 51, 224-233.
- Hosseini, S., Tarzi, B.G., Gharachorloo, M., Ghavami, M. ve Bakhoda, H. (2015). Optimization on the Stability of Linseed Oil-in-Water Nanoemulsions Generated by Ultrasonic Emulsification Using Response Surface Methodology (RSM). Orient J Chem., 31(2), 1223-1230.

http://www.pharmasm.com/pdf_files/20170411011405_27_gopal%20_2_.pdf (erişim tarihi 28.08.2023)

<https://barakat-pharma.com/product/diclobar/> (erişim tarihi 28.08.2023)

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Blausen_0810_SkinAnatomy_01.png (Erişim tarihi 15. 07.2023)

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melissa_officinalis_sl4.jpg (Erişim tarihi 15. 07.2023)

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Star_anise.jpg (Erişim tarihi 15. 07.2023)

<https://my.clevelandclinic.org/health/body/21901-epidermis> (Erişim tarihi 17. 07.2023)

<https://pharmeasy.in/health-care/products/volini-joint-xpert-20-gm-gel-3010937> (Erişim tarihi 17. 07.2023)

<https://tr.depositphotos.com/63100959/stock-photo-skin.html> (Erişim tarihi 25. 07.2023)

<https://www.abilenederm.com/skin-layers> (Erişim tarihi 25 . 07.2023)

<https://www.qatarpharmacy.qa/product/reumadep-emulgel-50ml/> (erişim tarihi 28.08.2023)

<https://www.voltaren.ca/en/products/topical-gels/emulgel-extra-strength/> (erişim tarihi 28.08.2023)

İnce Köse, T., & Gençler Özkan, A. Y. Ş. E. (2022). Antiviral Etkili Bitkiler. *Genome Research*, 46(2). *International Journal of Drug Development and Research* 0975-9344

Jaiswal, M., Dudhe, R., & Sharma, P. K. (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, 5, 123-127.

Jiang, Y. C., Feng, H., Lin, Y. C., & Guo, X. R. (2016). New strategies against drug resistance to herpes simplex virus. *International journal of oral science*, 8(1), 1-6.

Johnson S, (2015). *Evidence-Based Essential Oil Therapy: The Ultimate Guide to the Therapeutic and Clinical Application of Essential Oils*

- Karadağ, A. E., Demirci, B., Çaşkurlu, A., Demirci, F., Okur, M. E., Orak, D., ... & Başer, K. H. C. (2019). In vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. flower extract fractions. *South African Journal of Botany*, 125, 214-220.).
- Kashyap, N., Kumari, A., Raina, N., Zakir, F., & Gupta, M. (2022). Prospects of essential oil loaded nanosystems for skincare. *Phytomedicine Plus*, 2(1), 100198.
- Keen, M. A., & Hassan, I. (2016). Vitamin E in dermatology. *Indian dermatology online journal*, 7(4), 311.
- Kerna, N. A., & Anderson, I. I. (2021). J, Pruitt KD, Flores JV, Ortigas MAC, Carsrud NDV, Holets HM, Nomel R, Nwokorie U, Nwachukwu D. "Star Anise: A Purported Antiviral Herb with Numerous Associated Health Benefits". *EC Clinical and Medical Case Reports*, 4, 63-73.
- Khurana, S., Jain, N. K., & Bedi, P. M. S. (2013). Nanoemulsion based gel for transdermal delivery of meloxicam: physico-chemical, mechanistic investigation. *Life sciences*, 92(6-7), 383-392.
- K-Husnu-Can Baser. 2009
Ogulutu_Melissa_officinalis_L/links/56a7f9f808aeded22e371de3/Ogulutu-Melissa-officinalis-L.pdf
- Koch, C., Reichling, J., Schneele, J., & Schnitzler, P. (2008). Inhibitory effect of essential oils against herpes simplex virus type 2. *Phytomedicine*, 15(1-2), 71-78.
- Lovelyn, C. ve Attama, A.A., (2011). "Current State of Nanoemulsions In Drug Delivery", *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2(05): 626.
- Loizzo, M. R., Saab, A. M., Tundis, R., Statti, G. A., Menichini, F., Lampronti, I., ... & Doerr, H. W. (2008). Phytochemical analysis and in vitro antiviral activities of the essential oils of seven Lebanon species. *Chemistry & biodiversity*, 5(3), 461-470.

- Li, P. H., & Chiang, B. H. (2012). Process optimization and stability of D-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(1), 192-197.
- Minami, M., Kita, M., Nakaya, T., Yamamoto, T., Kuriyama, H., & Imanishi, J. (2003). The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiology and immunology*, 47(9), 681-684.
- Mou, D., Chen, H., Du, D., Mao, C., Wan, J., Xu, H., & Yang, X. (2008). Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1-2), 270-276.
- Nazir, I., & Gangoo, S. A. (2022). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils. In *Essential Oils-Advances in Extractions and Biological Applications*. IntechOpen.
- Osborne, D. W., & Musakhanian, J. (2018). Skin Penetration and Permeation Properties of Transcutol®-Neat or Diluted Mixtures. *AAPS PharmSciTech*, 19(8), 3512-3533.
- Oth, C., Acuña-Hinrichsen, F., Leyton, L., Martin, C., & Concha, M. I. (2016). 'Herpes simplex virus type 1 at the central nervous system. *Herpesviridae*, ed. J. Ongradi (Rijeka: InTech), 11-30.
- Özdemir, (2019). C. Özdemir, C. Diatomitin dielektrik, elektrokinetik ve viskoelastik özelliklerinin araştırılması (Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Patra, J. K., Das, G., Bose, S., Banerjee, S., Vishnuprasad, C. N., del Pilar Rodriguez-Torres, M., & Shin, H. S. (2020). Star anise (*Illicium verum*): Chemical compounds, antiviral properties, and clinical relevance. *Phytotherapy Research*, 34(6), 1248-1267.

- Perdiguer AC, Dachs FJG, Carreras N, Valdivia (1997) Nanoemulsion of the oil water type, useful as an ophthalmic vehicle and process for the preparation thereof Assignee: Laboratorios Cusi, S.A. (Barcelona, ES)
- Pongsumpun, P., Iwamoto, S., & Siripatrawan, U. (2020). Response surface methodology for optimization of cinnamon essential oil nanoemulsion with improved stability and antifungal activity. *Ultrasonics sonochemistry*, 60, 104604.
- Pourchet, A., Modrek, A. S., Placantonakis, D. G., Mohr, I., & Wilson, A. C. (2017). Modeling HSV-1 latency in human embryonic stem cell-derived neurons. *Pathogens*, 6(2), 24.
- Pourghanbari, G., Nili, H., Moattari, A., Mohammadi, A., & Iraj, A. (2016). Antiviral activity of the oseltamivir and *Melissa officinalis* L. essential oil against avian influenza A virus (H9N2). *VirusDisease*, 27, 170-178.
- Pouton CW (1997) Formulation of selfemulsifying drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 25:47–58
- Pozo, M., Armijo, F., Maraver, F., Zuluaga, P., Ejeda, J. M., & Corvillo, I. (2019). Variations in the texture profile analysis (TPA) properties of clay/mineral-medicinal water mixtures for pelotherapy: Effect of anion type. *Minerals*, 9(3), 144.
- Reichling, J. (2021). Antiviral and virucidal properties of essential oils and isolated compounds—A scientific approach. *Planta Medica*.
- Selmi, S., Rtibi, K., Hosni, K., & Sebai, H. (2022). Essential Oil, Chemical Compositions, and Therapeutic Potential. *Essential Oils: Advances in Extractions and Biological Applications*, 163.

- Sengupta, P., & Chatterjee, B. (2017). Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. *International journal of pharmaceutics*, 526(1-2), 353-365.
- Serag, M. S., Elfayoumy, R. A., & Mohesien, M. T. (2022). Essential Oils as Antimicrobial and Food Preservatives. *Essential Oils: Advances in Extractions and Biological Applications*, 75.
- Schnitzler, P., Schön, K., & Reichling, J. (2001). Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Die Pharmazie*, 56(4), 343-347.
- Schnitzler, P., Schuhmacher, A., Astani, A., & Reichling, J. (2008). Melissa officinalis oil affects infectivity of enveloped herpesviruses. *Phytomedicine*, 15(9), 734-740.
- Schuhmacher, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. J. P. V. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*, 10(6-7), 504-510.
- Sharafan, M., Jaferník, K., Ekiert, H., Kubica, P., Kocjan, R., Blicharska, E. ve Szopa, A. (2022). Illicium verum (Star Anise) and Trans-Anethole as Valuable Raw Materials for Medicinal and Cosmetic Applications. *Molecules* , 27 (3), 650.
- Sharma Bhavesh, R., & Shah, C. N. (2016). Nanoemulgel: a comprehensive review on the recent advances in topical drug delivery. *Pharma Sci Monit*, 7(2), 346-355.
- Sharma R.B., Kumar G., Thakur H, Tomar S., (2023) Nanoemulgel: A Novel Approach for Topical Delivery System: Updated Review
- Sharma, N., Bansal, M., Visht, S., Sharma, P. K., & Kulkarni, G. T. (2010). Nanoemulsion: A new concept of delivery system. *Chronicles of Young Scientists*, 1(2), 2-6.

- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and food Chemistry*, 45(8), 3197-3201.
- Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ (2005) Nanoemulsions. *Curr Opin Coll Interface Sci* 10:102–110
- Stephane, F. F. Y., & Jules, B. K. J. (2020). Terpenoids as important bioactive constituents of essential oils. *Essential oils-bioactive compounds, new perspectives and applications*, 1-15.
- Sultana, N., Akhtar, J., Khan, M. I., Ahmad, U., Arif, M., Ahmad, M., & Upadhyay, T. (2022). Nanoemulgel: For Promising Topical and Systemic Delivery.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Coll Interface Sci* 108:303–318
- Tayeb, H. H., Felimban, R., Almaghrabi, S., & Hasaballah, N. (2021). Nanoemulsions: Formulation, characterization, biological fate, and potential role against COVID-19 and other viral outbreaks. *Colloid and Interface Science Communications*, 45, 100533.
- Tiwari SB, Amiji MM (2006) Nanoemulsion formulations for tumortargeted delivery. *Nanotech Cancer Therapy*. Taylor and Francis Group Editors, pp 723–739
- van de Sand, L., Bormann, M., Schmitz, Y., Heilingloh, C. S., Witzke, O., & Krawczyk, A. (2021). Antiviral active compounds derived from natural sources against herpes simplex viruses. *Viruses*, 13(7), 1386.
- Wulff-Perez, M., Torcello-Gomez, A., Galvez-Ruiz, M.J. ve Martin-Rodriguez A. (2009). Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloids*, 23(4), 1096–1102

- Xin, X., Zhang, H., Xu, G., Tan, Y., Zhang, J., & Lv, X. (2013). Influence of CTAB and SDS on the properties of oil-in-water nano-emulsion with paraffin and span 20/Tween 20. *Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 418, 60-67.
- Yang, Y., Leser, M. E., Sher, A. A., & McClements, D. J. (2013). Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (Q-Naturale®). *Food Hydrocolloids*, 30(2), 589-596.
- Zhang, K., Lv, D., Li, R. (2019). Conserved herpesvirus protein kinases target samhd1 to facilitate virus replication. *Cell Reports*, 28(2), 449-459.e5. [CrossRef]

ÖZGEÇMİŞ



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

UÇUK ÜZERİNDE ETKİLİ BİTKİSEL KAYNAKLI ANTİVİRALLERİ
İÇEREN TOPİKAL NANOEMÜLJEL FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

%15

BENZERLİK ENDEKSİ

%14

İNTERNET KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%7

2

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%4

3

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

%1

4

www.mikrobiyolbul.org

İnternet Kaynağı

<%1

5

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

<%1

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%1

7

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

<%1

8

www.sevgionel.com

İnternet Kaynağı

<%1