



**TOPIKAL NANOEMÜLSİYON
FORMÜLASYONLARININ GELİŞTİRİLMESİ
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Afife Büşra UĞUR

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Meltem ÇETİN**

Doktora Tezi - 2017

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TOPIKAL NANOEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Afife Büşra UĞUR

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Meltem ÇETİN**

**II. Tez Danışmanı
Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU**

**ERZURUM
2017**

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**TOPIKAL NANOEMÜLSİYON FORMÜLASYONLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Afife Büşra UĞUR

Tez Savunma Tarihi : 26.10.2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Meltem ÇETİN (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Fahriye Figen TIRNAKSIZ (Gazi Üniversitesi)


Jüri Üyesi : Prof. Dr. İmran VURAL (Hacettepe Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Abdulkadir ÖZER (Atatürk Üniversitesi)

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Ayşe BAYRAKÇEKEN YURTCAN
(Atatürk Üniversitesi)

Onay

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehtap TAN
Enstitü Müdürü

Doktora Tezi
ERZURUM - 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nanoemülsiyonlar	3
2.1.1. Nanoemülsiyon Kavramı ve Özellikleri	3
2.1.2. Emülsiyon, Nanoemülsiyon ve Mikroemülsiyon Arasındaki Farklar	6
2.1.3. Nanoemülsiyonların Oluşum Mekanizması.....	7
2.1.4. Nanoemülsiyonların Hazırlanmasında Kullanılan Yöntemler.....	9
2.1.4.1. Yüksek Enerji Gerektiren Yöntemler	10
2.1.4.2. Düşük Enerji Gerektiren Yöntemler	14
2.1.5. Nanoemülsiyonların Kullanım Alanları.....	16
2.2. Daidzein (DZ)	25
2.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri.....	25
2.2.2. Farmakolojik Özellikleri.....	36
2.3. Cilt Kanseri	39
3. MATERYAL VE METOT	50
3.1. Materyal	50
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	51

3.2. Metot.....	52
3.2.1. DZ'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini	52
3.2.1.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrumu	52
3.2.1.2. UV Spektrumu	52
3.2.2. DZ'nin HPLC ile Miktar Tayini	52
3.2.2.1. DZ'ye Ait Kalibrasyon Doğrusu.....	53
3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu	53
3.2.3. Formülasyon Çalışmaları	56
3.2.3.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	56
3.2.3.2. Nanoemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanması.....	57
3.2.3.3. NE-Bazlı Jel Formülasyonlarının Hazırlanması	57
3.2.3.4. Klasik Emülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması.....	58
3.2.4. Hazırlanan Formülasyonların Karakterizasyonu	59
3.2.4.1. Santrifüj Testi	59
3.2.4.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı ve Zeta potansiyel Ölçümü.....	59
3.2.4.3. pH Tayini	60
3.2.4.4. Reolojik Analiz	60
3.2.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi.....	60
3.2.4.6. FT-IR Analizi.....	60
3.2.4.7. Morfolojik Analizler	60
3.2.5. İn Vitro Salım Çalışmaları	61
3.2.5.1. DZ'nin İn Vitro Salım Ortamlarındaki Çözünürlük Tayini.....	61
3.2.5.2. İn Vitro Salım Koşullarında DZ Stabilitesinin İncelenmesi	62
3.2.5.3. İn vitro Salım Çalışması	62
3.2.6. Hazırlanan Formülasyonlara Ait Stabilite Çalışmaları.....	63

3.2.6.1. Makroskobik inceleme.....	63
3.2.6.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü.....	63
3.2.6.3. pH Tayini	64
3.2.6.4. Reolojik Analiz	64
3.2.6.5. Etkin Madde Stabilitesi.....	64
3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	64
3.2.7.1. Melanoma Hücre Hattında Sitotoksosite Çalışması	64
3.2.7.2. Fibroblast Hücre Hattında Sitotoksosite Çalışması	67
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	68
4. BULGULAR.....	69
4.1. DZ'nin Fizikokimyasal Özellikleri.....	69
4.2. DZ'nin HPLC ile Miktar Tayini	71
4.2.1. Kalibrasyon Doğrusu	71
4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu	73
4.2.2.1. Doğrusallık.....	73
4.2.2.2. Doğruluk	73
4.2.2.3. Kesinlik.....	74
4.2.2.4. Duyarlılık	75
4.2.2.5. Özgünlük.....	75
4.2.2.6. Stabilitate	75
4.3. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları	76
4.3.1. Santrifüj Testi	77
4.3.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü.....	77
4.3.3. pH Tayini	80
4.3.4. Reolojik Analiz	81

4.3.5. DSC Analizi.....	83
4.3.6. FT-IR Analizi.....	85
4.3.7. Morfolojik Analiz	90
4.4. İn Vitro Salım Çalışması.....	92
4.4.1. DZ'nin İn Vitro Salım Ortamındaki Çözünürlük Tayini	92
4.4.2. İn Vitro Salım Koşullarında DZ'nin Stabilitesi	93
4.4.3. <i>İn Vitro</i> Salım Çalışması.....	93
4.5. Stabilite Çalışmaları.....	95
4.5.1. Makroskobik İnceleme	95
4.5.2. Damlacık Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı	97
4.5.3. Zeta Potansiyel.....	101
4.5.4. pH Tayini	101
4.5.5. Reolojik Analiz	101
4.5.6. Etkin Madde Stabilitesi.....	105
4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	105
4.6.1. Melanoma Hücre Hattında Sitotoksosite Çalışması	105
4.6.2. Fibroblast Hücre Hattında Sitotoksosite Çalışması	107
5. TARTIŞMA	110
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	153
KAYNAKLAR	155
EKLER	192
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	192
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	193

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren, çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, karşılaştığım sorunlar karşısında her zaman yol gösteren ve destekleyen saygıdeğer danışman hocalarım Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU'na ve Prof. Dr. Meltem ÇETİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarımın büyük bir kısmını gerçekleştirdiğim Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı'nda, laboratuvar imkanlarını sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Sema ÇALIŞ'a, Sayın Prof. Dr. Betül ARICA YEĞİN'e, ilgi ve yardımlarıyla her zaman beni destekleyen Sayın Doç. Dr. Hakan EROĞLU'na, fibroblast hücrelerinin sağlanmasındaki desteğinden dolayı Prof. Dr. Ahmet HACİMÜFTÜOĞLU'na, hücre kültürü çalışmalarımda yardımcı olan değerli dostum Dr. Ali TAGHİZADEHGHAEHJOUGHİ'ne teşekkürlerimi sunarım. Doktora tezindeki hücre kültürü çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Ankara Şap Enstitüsü Müdürlüğü çalışanlarına başta Bio. Taibe ARSOY olmak üzere yardımlarından ve arkadaşlıklarından dolayı teşekkür ederim. Bu çalışmayı 2015/079 BAP proje numarası ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, çalışmalarım sırasında yardımcı olan, güç ve desteğini esirgemeyen Ecz. Dilara ÖRGÜL'e, Ecz. Büşra SERVER'e, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan arkadaşlarım Ecz. Ahmet Osman YILDIZ'a, Serhat BEKAR'a, Lale DUYSAK'a ve Gökhan KAPLAN'a teşekkür ederim. Tüm yaşamım boyunca olduğu gibi tez çalışmalarım sırasında da her zaman yanımda olan, maddi manevi destekleyen, bana inanan ve güvenen annem Deniz Ülkü UĞUR'a ve babam Muzaffer UĞUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Afife Büşra UĞUR

ÖZET

Topikal Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve *In Vitro* Değerlendirilmesi

Amaç: Cilt kanseri (melanoma) tedavisine yönelik daidzein (DZ) içeren topikal nanoemülsiyon (NE) ve nanoemülsiyon bazlı jel (NEJ) formülasyonları hazırlanmış ve *in vitro* karakterizasyon çalışmaları (morfolojik inceleme, damlacık boyutu, zeta potansiyel, salım çalışması, stabilite çalışması, viskozite ve pH ölçümleri) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, formülasyonların melanoma (SK-MEL 30/An1) ve normal dermal fibroblast (PCS-201-012) hücre hatlarında sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir.

Materyal ve Metot: DZ'nin miktar tayini için HPLC tayin yöntemi geliştirilmiş ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Yağ fazı olarak etil oleat (%10), DMSO (%5), sürfaktan olarak Tween 80 (%10) ve Lipoid S100 (%5) ve ultra saf su kullanılarak kaba emülsiyon hazırlanmış ve daha sonra bu kaba emülsiyon yüksek basınçlı homojenizatörden geçirilerek (2 devir) boş ve DZ içeren nanoemülsiyon formülasyonları (B-NE ve DZ-NE) hazırlanmıştır. Bunun dışında, jelleştirme ajanı olarak %1 Protasan™ UP G 213 kullanılarak nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonları (B-NEJ ve DZ-NEJ) geliştirilmiştir. Ayrıca, boş ve daidzein içeren klasik emülsiyon formülasyonları (B-KE, D-KE) da hazırlanmıştır. Tüm formülasyonların damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı, zeta potansiyel, viskozite ve pH değerleri belirlenmiştir. Stabilite (4 °C ve 25 °C'de) ve *in vitro* salım (%5 SDS içeren PBS pH 7.4'de) çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MTT yöntemi kullanılarak formülasyonların insan melanoma ve normal fibroblast hücre hatlarında sitotoksik etkileri incelenmiştir.

Bulgular: Damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri, B-NE ve DZ-NE için sırasıyla 151.12±2.70 ve 149.80±3.52 nm ($p>0.05$) ve -22.57±0.78 ve -19.32±1.06 mV ($p<0.05$); B-NEJ ve DZ-NEJ için 191.48±5.26 ve 200.25±11.09 ($p>0.05$) ve 18.67±0.59 ve 19.35±0.66 mV ($p>0.05$); B-KE ve DZ-KE için 2.830±0.011 ve 4.420±0.017 µm ($p<0.05$) ve -15.50±0.75 ve -14.67±0.43 mV ($p<0.05$) olarak tespit edilmiştir. Protasan™ UP G 213 varlığında B-NEJ ve DZ-NEJ için pozitif zeta potansiyel değerleri elde edilmiş ve NE formülasyonları ile karşılaştırıldığında önemli bir viskozite artışı sağlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların cilt ile uyumlu pH değerlerine (pH 4.53-5.54) sahip olduğu saptanmıştır. En küçük damlacık büyüklüğüne sahip DZ-NE formülasyonundan daha yüksek miktarda DZ salımı gerçekleşmiştir. Stabilite çalışması süresince (90 gün) NE ve NEJ formülasyonlarının damlacık büyüklüklerinin nano-aralıkta kaldığı ve mutlak zeta potansiyel değerlerinin ise yaklaşık 20-40 mV olduğu tespit edilmiştir. Tüm formülasyonlar, melanoma hücre hattına karşı saf DZ'nin sitotoksik etkisini korumuştur. Diğer taraftan, saf DZ'nin ve tüm formülasyonların normal fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği de tespit edilmiştir.

DZ içeren NE ve NEJ formülasyonları başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. DZ'nin topikal olarak uygulanması ve cilt kanseri tedavisi için hazırlanan NE ve NEJ formülasyonları faydalı taşıyıcı sistemler olabilir.

Anahtar Kelimeler: Cilt kanseri, daidzein, fibroblast hücre hattı, melanoma hücre hattı, nanoemülsiyon, nanoemülsiyon-bazlı jel, stabilite

ABSTRACT

The Development and *In Vitro* Evaluation of Topical Nanoemulsion Formulation

Aim: Topical nanoemulsion (NE) and nanoemulsion-based gel (NEG) formulations containing daidzein (DZ) for the treatment of skin cancer (melanoma) were prepared and *in vitro* characterization studies (morphological analysis, droplet size, zeta potential, release study, stability study, viscosity and pH measurements) were performed. In addition, cell culture studies were performed to evaluate the cytotoxic effects of the formulations on melanoma (SK-MEL 30/An1) and normal dermal fibroblast (PCS-201-012) cell lines.

Materials and Methods: HPLC method for quantification of DZ was developed and validated. The coarse emulsion was prepared using ethyl oleate (10%), DMSO (5%) as the oil phase, Tween 80 (10%) and Lipoid S100 (5%) as surfactant and ultrapure water and then blank nanoemulsion and nanoemulsion containing DZ formulations (B-NE and DZ-NE) were prepared by passing the coarse emulsion through high-pressure homogenizer (2 cycles). Furthermore, nanoemulsion-based gel formulations (B-NEG and DZ-NEG) were developed using 1% Protasan™ UP G 213 as the gelling agent. And also, blank conventional emulsion and conventional emulsion containing DZ formulations (B-CE, DZ-CE) were also prepared. The droplet size, size distribution, zeta potential, viscosity and pH values of all formulations were determined. Stability (at 4 °C and 25°C) and *in vitro* release (in PBS pH 7.4 with %5 SDS) studies have were performed. Using MTT method, the cytotoxic effects of formulations was evaluated against human melanoma and normal fibroblast cell lines.

Results: Droplet size and zeta potential values were 151.12 ± 2.70 and 149.80 ± 3.52 nm ($p > 0.05$) and -22.57 ± 0.78 and -19.32 ± 1.06 mV ($p < 0.05$) for B-NE and DZ-NE, 191.48 ± 5.26 and 200.25 ± 11.09 nm ($p > 0.05$) and 18.67 ± 0.59 and 19.35 ± 0.66 mV ($p > 0.05$) for B-NEG and DZ-NEG, 2.830 ± 0.011 and 4.420 ± 0.017 μm ($p < 0.05$) and -15.50 ± 0.75 and -14.67 ± 0.43 mV ($p < 0.05$) for B-CE and DZ-CE, respectively. Positive zeta potential values for B-NEG and DZ-NEG were obtained and a significant viscosity increase was achieved in the presence of Protasan™ UP G 213 compared to the NE formulations. It was determined that the prepared formulations had pH values (pH 4.53-5.54) compatible with the skin. Higher amount of DZ was released from the DZ-NE with the smallest droplet size. During the stability study (90 days), it was determined that the NE and NEG formulations have droplet sizes in the nano-range and their absolute zeta potential values were about 20-40 mV. All formulations maintained the cytotoxic effect of DZ against the melanoma cell line. Moreover, it was also found that pure DZ and all formulations had no cytotoxic effect on normal fibroblast cells.

Conclusion: DZ-containing NE and NEG formulations were successfully prepared. The prepared NE and NEG formulations might be useful delivery systems for the topical application of DZ and treatment of skin cancer.

Key Words: Daidzein, fibroblast cell line, melanoma cell line, nanoemulsion, nanoemulsion-based gel, skin cancer, stability

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

5-ALA	:5-Aminolevülinik Asit
AJCC	: Amerikan Kanser Komite Birliği
ATCC	: American Type Culture Collection
CMC	: Kritik Misel Konsantrasyonu
DB	: Damlacık Boyutu
DCM	: Diklorometan
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DZ	: Daidzein
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
G3 PAMAM	: 3. Nesil Poliamido Amin
G4 PPI	: 4.Nesil Polipropilen İmin
HLB	: Hidrofilik-Lipofilik Denge
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
HPMC	: Hidroksipropilmetil Selüloz
ILP	: İzole Ekstremitte Perfüzyonu
INF	: İnterferon
IPM	: İzopropil Miristat
KE	: Klasik Emülsiyon
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOD	: Saptama Sınırı

LOQ	: Miktar Tayin Sınırı
MDA	: Malondialdehit
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolyum Bromür
mV	: Milivolt
NE	: Nanoemülsiyon
NEJ	: Nanoemülsiyon Bazlı jel
NSAID	: Non-Steroidal Antiinflamatuvar İlaç
PARP	: Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PB	: Fosfat Tamponu
PBS	: Fosfat tampon Çözeltisi
PC	: Fosfatidilkolin
PDI	: Polidispersite indeksi
PE	: Fosfatidiletanolamin
PEG	: Polietilen Glikol
PG	: Propilen Glikol
PI	: Fosfatidilinositol
PL	: Fosfolipit
PLGA	: Poli(Laktik-ko-Glikolik Asit)
PTX	: Paklitaksel
PVA	: Polivinil Alkol
R2	: Belirlilik Katsayısı
ROS	: Serbest Oksijen Radikalleri
S/Y	: Yağ İçinde Su Emülsiyonu
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SMEDDS	: Kendiliğinden Mikro-Emülsifiye Olabilen Sistemler

SOD	: Süperoksit Dismutaz
SS	: Standart Sapma
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
UV	: Ultra Viole
VK	: Varyans Katsayısı
Y/S	: Su İçinde Yağ Emülsiyonu
YBH	: Yüksek Basıncılı Homojenizatör
YEM	: Yüzey Etkin Madde
λ_{max}	: Maksimum Dalga Boyu

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Nanoemülsiyon oluşumu	7
Şekil 2.2. Serbest enerji değişimi	8
Şekil 2.3. “Laplace” basıncı	9
Şekil 2.4. DZ'nin kimyasal yapısı	25
Şekil 3.1. Analitik yöntem validasyon parametreleri	53
Şekil 3.2. % Hücre canlılığının hesaplanması amacıyla kullanılan eşitlik	65
Şekil 4.1. DZ'ye ait FT-IR spektrumu	70
Şekil 4.2. DZ'ye ait UV spektrumu	71
Şekil 4.3. DZ'ye ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi	72
Şekil 4.4. Artan konsantrasyonlardaki DZ standart çözeltileri için elde edilen HPLC kromatogramları	72
Şekil 4.5. DZ'in 10 µg/mL derişimdeki çözeltilisine ait kromatogram	72
Şekil 4.6. Metanol, B-NEJ, B-NE, B-KE ve DZ'ye ait kromatogramlar	76
Şekil 4.7. B-NE formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı	78
Şekil 4.8. DZ-NE formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı	78
Şekil 4.9. B-NEJ formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı	79
Şekil 4.10. DZ-NEJ formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı	79
Şekil 4.11. NE ve NEJ formülasyonlarına ait damlacık büyüklüklerinin karşılaştırılması	79
Şekil 4.12. Nanoemülsiyon formülasyonlarına ait akış reogramları	81
Şekil 4.13. Nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonlarına ait akış reogramı	82
Şekil 4.14. Klasik emülsiyonlara ait akış reogramı	82
Şekil 4.15. DZ'ye ait DSC termogramı	84

Şekil 4.16. Formülasyon bileşenlerine ait DSC termogramı	84
Şekil 4.17. DZ ve NE formülasyonlarına ait DSC termogramı	84
Şekil 4.18. DZ ve NEJ formülasyonlarına ait DSC termogramı	85
Şekil 4.19. DZ ve KE formülasyonlarına ait DSC termogramı	85
Şekil 4.20. DZ'ye ait FT-IR Spektrumu	86
Şekil 4.21. Etil oleata ait FT-IR Spektrumu	86
Şekil 4.22. Lipoid S100'e ait FT-IR spektrumu	86
Şekil 4.23. DMSO'ya ait FT-IR Spektrumu	87
Şekil 4.24. Tween 80'e ait FT-IR spektrumu	87
Şekil 4.25. B-NE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu	87
Şekil 4.26. DZ-NE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu	88
Şekil 4.27. B-NEJ formülasyonuna ait FT-IR spektrumu	88
Şekil 4.28. DZ-NEJ formülasyonuna ait FT-IR spektrumu	88
Şekil 4.29. B-KE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu	89
Şekil 4.30. DZ-KE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu	89
Şekil 4.31. DZ ve NE formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları	89
Şekil 4.32. DZ ve NEJ formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları	90
Şekil 4.33. DZ ve KE formülasyonlarına ait FT-IR spektrumu	90
Şekil 4.34. B-NE formülasyonuna ait TEM görüntüleri	91
Şekil 4.35. DZ-NE formülasyonuna ait TEM görüntüleri	91
Şekil 4.36. B-NEJ formülasyonuna ait TEM görüntüleri	91
Şekil 4.37. DZ-NEJ formülasyonuna ait TEM görüntüleri	92
Şekil 4.38. DZ-NE, DZ-NEJ ve DZ-KE formülasyonlarına ait salım grafikleri	94
Şekil 4.39. NE ve NEJ formülasyonlarına ait dijital fotoğraflar	96
Şekil 4.40. KE formülasyonlarına ait dijital fotoğraflar	97

Şekil 4.41. Saf DZ ve formülasyonların 24 saatlik inkübasyon sonrası melanoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri	106
Şekil 4.42. Saf DZ ve formülasyonların 48 saatlik inkübasyon sonrası melanoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri	107
Şekil 4.43. Saf DZ ve formülasyonların 24 saatlik inkübasyon sonrası fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri	108
Şekil 4.44. Saf DZ ve formülasyonların 48 saatlik inkübasyon sonrası fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri	109



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Nanoemülsiyon ve mikroemülsiyon özelliklerinin karşılaştırılması	7
Tablo 2.2. Farklı sıcaklıklarda, DZ'nin su, etanol ve etanol:su karışımlarındaki çözünürlük değerleri	29
Tablo 2.3. Farklı sıcaklıklarda, DZ'nin su, PG ve PG:su karışımlarındaki çözünürlük değerleri	30
Tablo 2.4. DZ'nin farklı çözücülerdeki çözünürlük bilgileri	32
Tablo 2.5. Clark düzeylerine göre melanomanın evrelendirilmesi	45
Tablo 2.6. TNM sistemindeki evreler	46
Tablo 3.1. DZ miktar tayini için kullanılan kromatografik koşullar	52
Tablo 3.2. B-NE ve DZ-NE formülasyon bileşenleri ve oranları	57
Tablo 3.3. Hücre kültürü çalışmasında kullanılan gruplar ile ilgili bilgiler	65
Tablo 4.1. Miktar tayini yöntemi için saptanan gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik (tekrar elde edilebilirlik) değerleri	74
Tablo 4.2. Miktar tayini yöntemi için saptanan tekrar edilebilirlik sonuçları	75
Tablo 4.3. DZ için elde edilen stabilite sonuçları	76
Tablo 4.4. NE ve NEJ formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri	78
Tablo 4.5. KE formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri	80
Tablo 4.6. Formülasyonlara ait pH değerleri	80
Tablo 4.7. Tüm formülasyonlara ait viskozite sonuçları	81
Tablo 4.8. Tüm formülasyonlara ait n ve r^2 değerleri	83

Tablo 4.9. DZ'nin <i>in vitro</i> salım ortamındaki (%5 SDS içeren PBS pH 7.4) çözünürlük değerleri	92
Tablo 4.10. <i>In vitro</i> salım koşullarında DZ'nin stabilitesi	93
Tablo 4.11. Formülasyonların salım kinetiklerinin değerlendirilmesi.....	94
Tablo 4.12. NE formülasyonlarına ait 90 günlük damlacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları	98
Tablo 4.13. NEJ formülasyonlarına ait 90 günlük damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımı sonuçları	99
Tablo 4.14. KE formülasyonuna ait 7 günlük damlacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları	100
Tablo 4.15. Stabilite çalışması süresince tüm formülasyonlar için tespit edilen zeta potansiyel değerleri.....	102
Tablo 4.16. Stabilite çalışması süresince tüm formülasyonlar için tespit edilen pH değerleri	103
Tablo 4.17. Stabilite çalışması süresince tüm formülasyonlar için tespit edilen viskozite değerleri.....	104
Tablo 4.18. Farklı sıcaklık ve zaman aralıklarında tüm formülasyonlar için tespit edilen etkin madde yüzdeleri	105

1. GİRİŞ

Melanoma ve melanoma olmayan (bazal hücreli karsinom, skuamoz hücreli karsinom) cilt kanseri tipleri mevcuttur. Son yıllarda, gerek melanoma gerekse melanoma olmayan cilt kanserlerinin insidansı artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya çapında her yıl 2-3 milyon melanoma olmayan ve 132000 de melanoma vakası görülmektedir. Cilt kanseri nedeniyle dünya çapında her yıl tahminen 60000 ölümün gerçekleştiği, bu ölümlerin çoğunluğunun (~48000) malign melanomadan kaynaklandığı, yaklaşık 12000 ölümün ise melanoma olmayan cilt kanserlerinden kaynaklandığı ifade edilmiştir. 20-29 yaş arası kadınlarda en sık görülen ikinci kanser tipidir ve cilt kanserlerinde en önemli risk faktörü UV ışınlarıdır. Flavonoidler (flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, kateşinler vb) bitkilerde bulunan ve insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunan doğal polifenolik bileşiklerdir. Soya fasülyesi ve soya ürünlerinde yoğun olarak bulunan antioksidan özelliğe sahip ve güçlü antikanserojen etkileri bulunan izoflavonlar (daidzein, genistein vb.) fitoöstrojenik bileşiklerdir. Antioksidan aktiviteli flavonoidler, cildin UV ışınlarından kaynaklanabilecek zararlı etkilere karşı korunması ("photoaging", ışık etkisiyle yaşlanma), cilt kanserinin önlenmesi ve cilt bakımı gibi amaçlarla topikal olarak uygulanmaktadır. Ancak birçok polifenolik bileşiğin intradermal olarak taşınması onların hem sulu hem de organik ortamlardaki düşük çözünürlükleri ve düşük permeabilitelerinden dolayı yetersizdir. Bundan dolayı, izoflavonların topikal kullanımına yönelik olarak farklı ilaç taşıyıcı sistemler (lipozom, mikroemülsiyon, nanoemülsiyon vb.) geliştirilmiştir. Daidzein, (4',7-dihidroksilizoflavon), suda çözünmeyen, başlıca "Leguminosae" familyası bitkilerinden elde edilen bir izoflavondur. Daidzeinin antienflamatuar, antioksidan, enzim inhibitörü vb. özellikleri vardır. Daha önceki çalışmalarda, daidzeinin kanser hücrelerinin büyümesini inhibe

ettiği, hyaluronik asit üretimini uyardığı ve topikal uygulandığında ise cildi oksidatif hasardan/UV ışınlarından koruduğu gösterilmiştir. Son yıllarda, nanoteknoloji alanındaki çalışmalara ilgi çok artmıştır. Nanotaşıyıcılar flavonoidlerin düşük çözünürlük, kısa yarı ömür ve düşük biyoyararlanım gibi problemlerinin üstesinden gelinmesi için uygun sistemlerdir. Nanoterapötik yaklaşımlar kanser teşhis ve tedavisi için önemli bir potansiyele sahiptir. Örneğin, nanotaşıyıcılar kanser direncinin aşılmasında, antikansorejenlerin toksik ve istenmeyen etkilerinin engellenmesinde/azaltılmasında, tedavi etkinliğinin ve hastanın yaşam kalitesinin artırılmasında önemli faydalar sağlayabilmektedir. Nanoemülsiyonların cilt ile ilgili uygulamaları son yıllarda yoğunluk kazanmıştır.

Bu çalışma, cilt kanseri tedavisine yönelik olarak daidzein içeren topikal nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonların hazırlanması, bu sistemlerin *in vitro* karakterizasyon çalışmalarının (morfolojik inceleme, damlacık boyutu, zeta potansiyel, santrifüj testi, salım çalışmaları, stabilite çalışması, viskozite ve pH ölçümleri) gerçekleştirilmesi, kanser ve normal hücre hatlarında (SK-MEL 30/An1 (insan melanoma hücreleri); PCS-201-012 (insan, normal, primer dermal fibroblast hücreleri) hazırlanan sistemlerin sitotoksik etkisinin MTT yöntemi kullanılarak değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanoemülsiyonlar

2.1.1. Nanoemülsiyon Kavramı ve Özellikleri

Nanoemülsiyon terimi genellikle dispers faz damlacık boyutu 1000 nm'den küçük olan emülsiyonlar için kullanılmaktadır. Genel olarak kabul gören damlacık boyutu ise 100-500 nm'dir.¹⁻³ Ancak, farklı çalışma grupları tarafından 20-200 nm⁴, 100-600⁵ ve 50-200 nm⁶ gibi farklı damlacık boyut aralıkları da kabul görüp kullanılmaktadır. Nanoemülsiyonlar, su fazı, yağ fazı ve yüzey etkin madde (YEM) ve/veya yardımcı YEM kullanılmasıyla hazırlanan, damlacıkların yağ veya su olma durumuna göre Y/S veya S/Y tipinde olabilen, iç faz damlacık boyutuna bağlı olarak da şeffaf veya yarı-şeffaf görünümünde olan kolloidal dağılımlardır. Nanoemülsiyonlar seyreltme, pH ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmezler. Kinetik olarak stabil ancak termodinamik açıdan stabil olmayan sistemlerdir ve uzun süreli fiziksel stabilite (metastabil) gösterirler.^{1, 4, 7-10} Bu nedenle, bazen bu uzun süreli fiziksel stabiliteden dolayı nanoemülsiyonların termodinamik stabiliteye yaklaştığı söylenmektedir.⁶ Nanoemülsiyonların damlacık boyutlarının çok küçük olması uzun süreli olarak kremalaşma ve flokülasyonu engeller. Nanoemülsiyonların hazırlanması için dışarıdan enerji (mekanik enerji veya sistem bileşenlerinin kimyasal potansiyeli) verilmesi gerekmektedir.¹¹

Nanoterapötik yaklaşımlar kanser teşhis ve tedavisi için muazzam bir potansiyele sahiptir. Örneğin, nanotaşıyıcılar kanser direncinin aşılmasında, antikansorejenlerin toksik ve istenmeyen etkilerinin engellenmesinde/azaltılmasında, tedavi etkinliğinin ve hasta yaşam kalitesinin artırılmasında önemli faydalar sağlayabilmektedir.¹²⁻¹⁴ Nanoemülsiyonların cilt ile ilgili uygulamaları son yıllarda yoğunluk kazanmıştır. Nanoemülsiyonlar, nanopartikül, lipozom gibi nano-taşıyıcılara göre daha yüksek deri

geçirgenliğine ve tutunma potansiyeline sahiptir. Dolayısıyla, gerek farmasötik (gen, antikanserojen etkin maddeler gibi) gerekse kozmetik (emülsiyon bazlı-yaşlanma karşıtı kremler, cilt temizleyici losyonlar gibi) alanında yüksek potansiyele sahip taşıyıcı sistemlerdir. Nanoemülsiyonlar fiziksel özellikleri ve kinetik stabiliteleri nedeniyle diğer kolloidal yapılardan çok daha fazla kullanılabilirliğe sahip taşıyıcı sistemlerdir. Hazırlanmalarında kullanılacak yöntem, maliyet, işlem süresi ve hazırlanacak nanoemülsiyonun miktarı dikkate alınarak seçilmektedir.^{4, 8, 10, 11} Lipofilik özellikteki maddelerin yağ/su tipi nanoemülsiyon şeklinde hazırlanması, hangi yoldan kullanılırsa kullanılsın, bu maddelerden sağlanan biyolojik yararın artmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, son yıllarda nanoemülsiyonlar ile gittikçe artan sayıda çalışmanın yapıldığı dikkati çekmektedir. Bu çalışmaların sonucunda, ileride çok daha fazla sayıdaki ürün, ilaç ve kozmetik pazarına girecektir.^{4, 8, 10, 11}

Nanoemülsiyonların Üstünlükleri:^{1, 6, 15-17}

- Yüksek kinetik stabiliteye sahiptirler.
- Damlacık boyutlarının çok küçük olması sebebiyle Brown hareketleri yerçekimi etkisine göre daha baskındır. Dolayısıyla, saklama sırasında sedimentasyon ve kremalaşma olayları görülmez.
- Damlacık büyüklüğünün küçük olması ve damlacıklar etrafında YEM'lerin oluşturduğu dayanıklı film sayesinde, damlacıklar arasında flokülasyonun ve koalesensin önlenmesi sonucu olası bir faz ayrımının önüne geçilmesi sağlanmıştır.
- Nanoemülsiyonlar, etkin maddelerin deri yoluyla verimli bir şekilde taşınması için uygun sistemlerdir.
- Nanoemülsiyon sisteminin yüzey geriliminin ve damlacık boyutunun oldukça küçük, yüzey alanının ise oldukça geniş olması, damlacıkların deri yüzeyinde

tek düze olarak dağılmasını ve deriye kolayca penetre olarak da etkin maddenin hızlı bir şekilde taşınmasını sağlar.

- Hem hidrofobik hem de hidrofilik etkin maddelerin bu sistemde çözünebilmesi sonucu bu maddelerin permeasyon ve biyoyararlanımlarında artış sağlanır.
- Formülasyonlarında kıvam artırıcı kullanılmadığından ve içerdikleri düşük yağ oranından dolayı akıcı olmaları ve bunun yanısıra şeffaf yapıları sayesinde ciltte oldukça hoş bir his bırakırlar.
- Cilt üzerine uygulamalarda, nanoemülsiyonların YEM içeriklerinin mikroemülsiyonlara göre düşük olması YEM'lerden kaynaklanabilecek cilt ile ilgili olumsuzlukların önüne geçilebilmesi açısından önemlidir.
- Etkin maddenin/maddelerin çevre şartlarından korunması, çözünürlük problemi olan etkin maddelerin çözünürlüğünün artırılması amacıyla hazırlanabilirler.
- Gerek beşeri gerekse veteriner amaçlı olarak uygulamaları söz konusudur.
- Esansların kişisel bakım ürünleri içinde kolaylıkla formüle edilebilmelerine olanak sağlarlar. Parfümler ise alkol içermeyecek şekilde bu yöntemle hazırlanabilmektedir.
- Aseptik ortamda filtrasyonla sterilize edilebilirler (çok küçük damlacık boyutlarından dolayı).
- Oral yolla kullanımda küçük damlacık boyutlarından dolayı etkin madde biyoyararlanımında artış sağlarlar.

Nanoemülsiyonların Sakıncaları:^{15, 18}

- Nanoemülsiyonların hazırlanabilmesi için özel cihazların (yüksek basınçlı homojenizatörler, ultrasonik karıştırıcılar vb.) ve özel hazırlama tekniklerinin kullanılması maliyeti artırmaktadır.
- “Oswalt ripening” etkisi ile damlacıkların büyümesi nanoemülsiyonlar için önemli bir stabilite problemidir.
- Erime noktası yüksek olan maddeler için düşük çözündürme kapasitesine sahiptir.

2.1.2. Emülsiyon, Nanoemülsiyon ve Mikroemülsiyon Arasındaki Farklar

Klasik (konvansiyonel, kaba) emülsiyonlar, damlacık büyüklüğü $>1 \mu\text{m}$ olan ve oluşumları için yüksek enerji gerektiren süt beyaz görünüme sahip fiziksel olarak stabil dağılımlardır. Termodinamik olarak stabil olmayan bu emülsiyonların formülasyonlarında %1-20 oranlarında YEM kullanılırken genellikle yardımcı YEM kullanılmaz.^{16, 19}

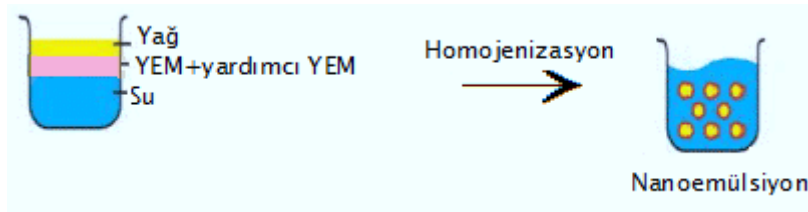
Nanoemülsiyon ve mikroemülsiyon kavramları arasında ise bir karışıklık söz konusudur. Son yıllarda, bu karışıklığı önlemek amacıyla bunlar, nano-boyutlu emülsiyonlar (kolloidal dağılımlar) başlığı altında toplanmış ancak stabiliteleri açısından kinetik olarak stabil emülsiyonlar (nanoemülsiyonlar) ve termodinamik olarak stabil emülsiyonlar (mikroemülsiyonlar) şeklinde iki grup halinde sınıflandırılmışlardır. Buna göre, mikroemülsiyonlar, damlacık boyutu 100 nm'nin altında olan ve termodinamik olarak stabil emülsiyonlar olarak tanımlanmaktadır. Mikroemülsiyonlar, genellikle yağ fazı, su fazı, YEM ve yardımcı YEM olmak üzere dört bileşen içeren ve kendiliğinden oluşan sistemlerdir.^{1, 7, 20, 21} Bu iki sistemin özellikleri Tablo 2.1'de özetlenmiştir.^{1, 7, 15}

Tablo 2.1. Nanoemülsiyon ve mikroemülsiyon özelliklerinin karşılaştırılması^{1, 7, 15}

Özellik	Nanoemülsiyon	Mikroemülsiyon
Fiziksel Görünüm	Şeffaf veya yarı-şeffaf	Şeffaf
Damlacık Büyüklüğü	Genellikle, 100-500 nm	100 nm'den küçük
Sinonim	Submikron emülsiyon/ miniemülsiyon/"ultrafine" emülsiyon	Miseller faz/mezofazlar/ liyotropik sıvı kristal faz/ şişmiş miseller
Yapısal oluşum	Küresel damlacıklar	Hekzogonal yapı/tabakalı "lamellar" yapı/solucan-benzeri miseller/küresel damlacıklar
YEM konsantrasyonu	Düşük (~% 3-10 a/a)	Yüksek (~% 20 a/a)
Hazırlama Yöntemi	Düşük veya yüksek enerji gerektiren yöntemler	Kendiliğinden emülsifikasyon
Stabilite	Kinetik olarak kararlı, metastabil, termodinamik olarak kararsız	Termodinamik olarak kararlı

2.1.3. Nanoemülsiyonların Oluşum Mekanizması

Birbiriyle karışmayan iki sıvının birbiri içinde dağıtılmasıyla dispers (iç) faz küçük damlacıklar halinde dış faz içerisinde dağılır ve sonuç olarak yüzey alanı oldukça genişler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Nanoemülsiyon oluşumu

Nanoemülsiyonların oluşumu sırasında Gibbs serbest enerjisindeki değişim (ΔG) 0'dan daha büyük olduğu için bu sistemler termodinamik olarak stabil değildir (Şekil 2.2).^{15, 22}

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A - T \cdot \Delta S$$

Şekil 2.2. Serbest enerji değişimi ΔG : Gibbs serbest enerji değişimi; γ : Yüzeyler arası gerilim (su-yağ); ΔA : Ara-yüzey alanındaki değişim; T: Sıcaklık; ΔS : Sistemdeki entropi değişimi.²²

Bir kural olarak nanoemülsiyonlarda fazlar arasındaki yüzeyler arası gerilim 1-10 mN/m'dir. Bundan dolayı, $\gamma \cdot \Delta A$ 'nın büyüklüğü, damlacık halinde dağılma ve yeni yüzeylerin oluşumu sonucu meydana gelen yüzey enerjisindeki artışın entropideki artışla karşılanamayacak kadar büyük olduğunu ifade eder. Termodinamik olarak stabil olmayan bu sistemleri, olası flokülasyon, koalesens, faz ayrımı gibi stabilite problemlerine karşı korumak üzere YEM'lerden faydalanılmaktadır. Kullanılan YEM tipine bağlı olarak nanoemülsiyonların elektrostatik (iyonik emülgatör kullanımı) ve sterik (non-iyonik emülgatör veya polimer kullanımı) stabilizasyonu sağlanmaktadır.²² Aynı zamanda, bu sistemlerde küçük damlacıkların oluşumu ve böylece yüzey alanı artışını sağlamak üzere sisteme enerji verilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak, kendiliğinden oluşmayan, damlacık oluşumu/yüzey alanı artışı için dışarıdan enerji verilen sistemler için $\gamma \cdot \Delta A \gg T \cdot \Delta S$ 'dir ve emülsiyon oluşması için gerekli $\Delta G > 0$ (pozitif)'dir. Mikroemülsiyonlar içinse fazlar arasındaki yüzeyler arası gerilim $10^{-1} \pm 10^{-3}$ mN/m'dir. Belli koşullar altında, $\gamma \cdot \Delta A < T \cdot \Delta S$ 'dir, mikroemülsiyonlar kendiliğinden oluşur, dışarıdan enerji verilmesi gerekmez ve termodinamik olarak kararlı sistemler elde edilmiş olur.^{15, 22}

Nanoemülsiyonların oluşumu sırasında büyük iç damlacıklar önce deforme olur ve daha sonra ise parçalanırlar. Damlacığın içi ile dışı arasındaki basınç farkını ifade eden "Laplace" basıncı (ΔP) damlacık deformasyonunu engeller (Şekil 2.3).¹⁵ ΔP

eşitliği de nanoemülsiyonların hazırlanması için enerji gereksinimini doğrulamaktadır.⁶

22

$$\Delta P = 2\gamma/r \quad (a)$$

$$\Delta P = \gamma (1/r_1 + 1/r_2) \quad (b)$$

Şekil 2.3. “Laplace” basıncı (a) küresel damlacıklar için (b) küresel olmayan damlacıklar için. r: damlacık yarıçapı.¹⁵

Bu eşitliğe göre, damlacık küçüldükçe ΔP artmakta ve damlacıkların daha da küçültülmesi ancak daha güçlü bir deformasyonla mümkün olmaktadır. Bu durum, nanoemülsiyon hazırlanmasında niçin enerji harcanması gerektiğini açıklamaktadır. Formülasyonda kullanılan YEM yüzeyler arası gerilimi düşürerek ΔP ve dolayısıyla damlacıkları küçültmek için gerekli enerjide azalma sağlar.¹⁵ Bu nedenle, uygun nanoemülsiyon formülasyonları için YEM seçimi önemlidir.^{6,22}

2.1.4. Nanoemülsiyonların Hazırlanmasında Kullanılan Yöntemler

Nanoemülsiyonlar yüksek veya düşük enerji gerektiren yöntemler veya bu yöntemlerin kombinasyonu ile hazırlanabilir.²² Yüksek enerji gerektiren yöntemlerde, sisteme yüksek enerji verilerek ara yüzey parçalanır ve nano-boyutlu damlacıklar oluşur. Düşük enerji gerektiren yöntemlerde ise belli bazı koşulların (faz dönüşümü olgusu, çözücü buharlaştırılması vb) değiştirilmesi veya su ile karıştırıldığında nanoemülsiyon oluşturan uygun karışımların kullanılması gerekir. Böylece, dışarıdan enerji verilmeden nano-boyutlu damlacıklar kendiliğinden oluşur ve yüksek enerji gerektiren yöntemlere göre çok daha küçük damlacıklar elde edilir. Yapılan ilk nanoemülsiyon çalışmalarında sıklıkla yüksek enerji gerektiren yöntemler kullanılmıştır. Son zamanlarda ise düşük enerji gerektiren yöntemlere ilgi giderek artmaktadır.^{18,22,23}

2.1.4.1. Yüksek Enerji Gerektiren Yöntemler

Yüksek enerji gerektiren yöntemler; yüksek hızla karıştırma, yüksek basınçlı homojenizasyon, ultrasonikasyon, mikroakışkanlaştırma ve membran emülsifikasyonu yöntemlerini kapsamaktadır.²²

- Yüksek Hızla Karıştırma

Yüksek hızla karıştırma yönteminde nanoemülsiyon oluşturmak için büyük damlacıkların parçalanmasını sağlayacak olan enerji kayma geriliminden sağlanmaktadır. Başlangıçta nanoemülsiyonların hazırlanmasında rotor-stator sistemler kullanılmıştır. Bu araçlarda karıştırma arttıkça damlacık boyutu azalmaktadır ancak damlacık boyutunu 200-300 nm'nin altına düşürmek oldukça güçtür. Bu yöntemle hazırlanan nanoemülsiyonların damlacık boyutları ve damlacık boyutu dağılımları yüksektir. Sürekli bir karıştırma sağlamak ve kayma gerilimini artırmak amacıyla kolloid değirmenleri kullanılmıştır. Daha etkili bir emülsifikasyon sağlama üzere "Silverson" rotor-stator karıştırıcı yaygın bir şekilde kullanılmıştır.²²

Bu hazırlama yönteminde, damlacık boyutuna ve emülsiyonun stabilitesine etki eden önemli parametreler karıştırma hızı, karıştırma süresi, iç faz hacmi, sürekli fazın viskozitesi ve rotor açıklığının büyüklüğü şeklinde sıralanabilir.^{24,25}

Daha stabil bir emülsiyon hazırlamak üzere bu yöntem ile mikroakışkanlaştırıcı ve ultrasonik emülsifikasyon yöntemleri birlikte kullanılabilir.^{26,27}

- Yüksek Basınçlı Homojenizasyon Yöntemi

Bu yöntem, düşük ve orta viskoziteye sahip sistemlerin emülsifikasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Nanoemülsiyonların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan bu yöntem, hazırlanan klasik emülsiyonun cihazın (yüksek basınçlı homojenizatör) içindeki dar bir aralıktan geçirilmesi ve bu sırada oluşan yüksek kayma gerilimi, türbülans ve kavitasyon etkisiyle ara yüzeyin parçalanması ve küçük damlacıkların

oluşması prensibine dayanır.^{11, 22} Bu yöntemde, homojenizatör içinden emülsiyonun geçirilme sayısı, emülsiyonun viskozitesi, uygulanan basınç ve sıcaklık damlacık boyutu üzerinde etkili olan faktörlerdir. Homojenizatör içinden geçirilme sayısı, basınç ve sıcaklık artıkça damlacık boyutu küçülür. Sürfaktanların denge adsorpsiyonuna ulaşması için gerekli süre genellikle bu tür dağılım koşullarında yeni damlacıkların oluşma süresinden daha uzundur.^{11, 22} Bu nedenle, adsorpsiyon hızı yüksek olan sürfaktanlar (YEM, emülgatör) tercih edilmelidir. Yeterli miktarda sürfaktan kullanılırsa bu yöntemle 50-350 nm damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyonlar elde edilebilir.²² Tek bir sürfaktan yerine sürfaktan karışımlarının kullanılması yüzey geriliminde daha fazla azalmaya neden olmaktadır. Sürfaktanın dış faz yerine iç fazda çözünmesi durumunda, damlacık boyutu daha küçük olmakta ve viskozitesi yüksek sistemlerin emülsifikasyonunda önem taşımaktadır. Bu yöntemle, genellikle, iç faz içeriği yüksek emülsiyon hazırlanmakta ve daha sonra seyreltilmektedir.²⁸

- ***Ultrasonik Emülsifikasyon***

Bu yöntem, çok küçük damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyon formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan hızlı ve etkili bir yöntem olarak bilinmektedir. Ultrasonik emülsifikasyon yönteminde, nanoemülsiyonların oluşması için gerekli enerji, 20 kHz'in üzerinde frekansa sahip ultrasonik dalgalardan sağlanmaktadır.²⁹ Emülsifikasyon, iki mekanizma üzerinden yürümektedir. Öncelikle, sonikasyonla dağılımı oluşturacak karışım içinde mekanik titreşimler oluşturulmaktadır. Daha sonra, bu titreşimlerin sonucu oluşan mikro-hava kabarcıklarının patlamasıyla açığa çıkan enerji büyük damlacıkları parçalamaktadır.^{29,30} Bu yöntemle hazırlanan nanoemülsiyonun damlacık boyutu, formülasyon bileşenlerinin konsantrasyonuna, yağ-sürfaktan oranına, dış fazın viskozitesine, emülsifikasyon süresine ve sisteme verilen enerjiye bağlı olarak değişmektedir.^{29,31} Ultrasonik enerjinin artırılmasıyla damlacık

boyutu düşmektedir. Ancak belli bir değerden sonra enerjinin ve uygulama süresinin artırılması damlacık boyutunda artışa sebep olabilmektedir.³⁰⁻³² Ultrasonik emülsifikasyon küçük damlacık boyutlarının elde edilmesine olanak sağlarken daha büyük damlacıkların da sistemde görülme ihtimali vardır.²² Etkili bir emülsifikasyon ancak ultrasonik probun yakın çevresinde meydana gelmektedir. Ultrasonik emülsifikasyonun kullanımı daha çok laboratuvar çalışmaları ya da küçük hacimli çalışmalar için uygundur.^{11,33}

- ***Mikroakışkanlaştırma Yöntemi***

Bu yöntemde, basınç oluşturan bir pompa sistemi ve çok sayıda mikrokanal içeren bir karıştırıcı kullanılmaktadır. Bu sistemlerde, mikrokanallarda basınç altında ilerleyen ve birbiri ile karışmayan iki sıvının çarpışması sonucu nanoemülsiyon oluşmaktadır.^{22,34} Basınç altında mikrokanallardan geçirme işlemi istenen damlacık boyutu elde edilinceye kadar tekrarlanır.^{22,28,35} Elde edilen nanoemülsiyon azot altında filtreden geçirilir ve böylece, büyük damlacıklardan kurtarılarak damlacık boyutu aralığı düşürülür.²⁸ Sisteme verilen enerjinin bir kısmı damlacıkların parçalanmasını sağlarken bir kısmı ise ısı olarak açığa çıkar. Dolayısıyla, bu sistemlerde soğutucu sistemlerin kullanımı gerekebilmektedir.³⁵ Mikroakışkanlaştırma yöntemi hem laboratuvar hem de endüstriyel ölçekli üretim için uygundur.²⁸

- ***Membran Emülsifikasyonu Yöntemi***

Çapraz akışlı (doğrudan/konvansiyonel) membran emülsifikasyonu, ön-karıştırmalı (“premix”) membran emülsifikasyonu ve mikrokanal emülsifikasyonu şeklinde farklı membran emülsifikasyon yöntemleri literatürde mevcuttur.^{36,37}

Çapraz akışlı membran emülsifikasyonunda, dış faz membran yüzeyi boyunca akarken, iç faz bir mikro-gözenekli membrandan dış faz içine basınç altında itilir.^{36,38} Membran emülsifikasyonu ilk olarak Nakashima ve ark.³⁸ tarafından ortaya atılmış ve

membran olarak “Shirasu-gözenekli cam” kullanılmıştır. Daha sonraki çalışmalarda ise polimerik, seramik ve metal yapıdaki membranlar da kullanılmıştır. Damlacık boyutunu etkileyen en önemli parametre seçilen membrandır. Membranın gözenekliliği, gözenek çapı, membran kalınlığı ve iç fazın membran yüzeyi ile yaptığı temas açısı damlacık boyutunu etkilemektedir. Damlacık boyutunu etkileyen diğer faktörler ise iç ve dış fazın viskoziteleri, uygulanan basınç ve sıcaklıktır.^{36, 39, 40} Bu yöntem için geçerli olası bazı sakıncalardan [düşük üretkenliğe yol açan nispeten düşük iç faz akışı (genellikle 0.01-0.1 m³/(m².saat)), iç faz yüksek viskoziteye sahip olduğunda tekdüze nanoemülsiyon damlacıklarının elde edilememesi, damlacık boyut aralığı düşük formülasyonun sadece tekdüze gözenekli bir membran kullanılarak hazırlanabilir olması vb.] dolayı ön-karıştırmalı membran emülsifikasyon yöntemi geliştirilmiştir. Ön-karıştırmalı membran emülsifikasyonu yönteminde, hazırlanan kaba emülsiyon membrandan geçirilerek damlacık boyutu küçültülmektedir.^{36,41,42} Damlacıkların boyutu genel olarak membranın ortalama gözenek çapından daha büyüktür. Membrandan geçirme işlemi birkaç kez tekrarlanarak daha küçük boyutlu ve daha dar bir boyut aralığına sahip damlacıklar elde edilebilmektedir.^{41,42} Konvansiyonel membran emülsifikasyon yöntemine göre kontrol edilmesi ve çalışılması daha kolay bir yöntemdir. Ancak, bu yöntemde membran kirlenmesi ciddi bir sorun oluşturabilir. Ayrıca, konvansiyonel yöntemle kıyasla daha küçük damlacıklı emülsiyon hazırlanmaktadır.⁴¹ Mikrokanal emülsifikasyonunda ise iç faz, silindirik yapıda olmayan mikrokanallardan basınç uygulanarak geçirilir ve küresel olmayan bir damlacık meydana getirir. Bu damlacık, mikrokanalın özel olarak tasarlanan geometrisine bağlı olarak arayüzey geriliminin etkisiyle küresel hale gelir ve boyutu küçülür. Bu yöntemde damlacık boyutunu etkileyen tek faktör mikrokanalların geometrik yapısıdır.³⁶ Bu yöntemin temel sakıncası üretimin düşük olmasıdır.³⁶

2.1.4.2. Düşük Enerji Gerektiren Yöntemler

Nanoemülsiyonların hazırlanmaları için düşük enerji gerektiren yöntemler yüksek enerji gerektiren yöntemlerden çok daha sonra geliştirilmiştir. Düşük enerji gerektiren yöntemler faz dönüşüm sıcaklığı yöntemi, emülsiyon dönüşüm noktası yöntemi, kendiliğinden emülsifikasyon (dengede olmayan sistemlerde) ve çözücü buharlaştırma yöntemlerini içerir.^{18, 22, 43, 44}

- *Faz Dönüşüm Sıcaklığı Yöntemi*

Faz dönüşüm sıcaklığı yönteminin temelinde, sıcaklığa bağlı olarak suya/yağa afinitesinde değişim gösteren sürfaktanlar bulunmaktadır. Örneğin, polioksietilen tipi iyonik olmayan sürfaktanların çözünürlüğü sıcaklıkla değişmektedir. Sıcaklık artışı ile bu tip sürfaktanların polioksietilen zincirlerinin dehidrasyonu sonucu lipofilik özellik gösterip S/Y tipi emülsiyon oluştururlarken düşük sıcaklıklarda ise polar gruplarının hidrasyonundan dolayı hidrofilik özellik gösterir ve Y/S tipi emülsiyon oluştururlar.^{43, 45, 46} İyonik olmayan bir sürfaktan kullanılarak S/Y emülsiyonu yüksek bir sıcaklıkta hazırlanır ve daha sonra soğutulursa (faz dönüşüm sıcaklığının altına) Y/S emülsiyonuna dönüşür.^{22, 45} Faz dönüşüm sıcaklığına yakın sıcaklıklarda arayüzey gerilimi küçük damlacıkların oluşumunu kolaylaştıracak şekilde çok düşüktür. Ancak, bu koşullarda koalesens eğilimide artmaktadır. Kinetik olarak kararlı ve damlacık boyutu dağılımı küçük nanoemülsiyonların hazırlanması için soğutma işlemi çok hızlı bir şekilde gerçekleştirilmelidir.^{22, 43}

Bu yöntem ısıtma işlemi gerektirdiği için tretinoin, peptid/protein gibi ısıya hassas maddeleri içeren formülasyonların hazırlanmasını stabilite açısından zorlaştırır. Ancak, sürfaktan karışımlarının kullanılmasıyla faz dönüşüm sıcaklığı düşürülebilir ve bu maddelerin parçalanması en aza indirilebilir.¹

- *Emülsiyon Dönüşüm Noktası Yöntemi*

Bu yöntemde, nanoemülsiyon hazırlanması sırasında sıcaklık sabit tutulurken sistemin bileşenleri arasındaki oran değiştirilir.⁴⁷ Bu yöntem, literatürde faz dönüşüm bileşenleri ya da titrasyon yöntemi olarak da adlandırılmaktadır.²² Örneğin, S/Y emülsiyonu oda sıcaklığında hazırlanıp daha sonra yavaş yavaş su ilave edilirse seyreltme sırasında S/Y emülsiyonu dönüşüm noktasından geçer ve Y/S emülsiyonuna dönüşür.⁴⁷ Bu dönüşüm noktasında arayüzey gerilimi çok düşüktür ve yüksek enerji gereksinimi olmaksızın küçük damlacıklar oluşur.⁴⁷ Burada, sürfaktanların difüzyonu nanodamlacık oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Doğrudan emülsiyonlar bu yöntemle hazırlandığında, sulu faz, yağ ve yağ fazında zayıf çözünen sürfaktan karışımına ilave edilir. Sulu fazın ilavesi, sürfaktanın yağ fazından sulu faza difüzyonuna neden olur; bu da düşük ara yüzey geriliminde nanodamlacık oluşumunu sağlar.^{22,46} Emülsiyon dönüşümü, elektrolitlerin, farklı sürfaktanların ve alkollerin kullanılmasıyla da gerçekleştirilebilir.²² Bu sistem, ısı gerektirmemesi bakımından endüstride tercih edilmektedir.⁴⁶

- *Kendiliğinden Emülsifikasyon ve Çözücü Buharlaştırma*

Bu yöntem, birbirleriyle dengede olmayan iki sıvı fazın biraraya getirilmesiyle kendiliğinden emülsifikasyonun gerçekleşmesi esasına dayanır. Bu süreçte, üç temel mekanizmadan bahsedilebilir. Bunlar; Gibbs-Marangoni etkisi, arayüzey geriliminin çok düşük olması (yaklaşık sıfır), aşırı doymun lokal alanlarda faz yoğunlaşmasının gerçekleşmesidir.²² Oluşan nanoemülsiyondaki damlacık boyutu ve damlacık boyutu dağılımı yüzeyler arası gerilime, sistemin viskozitesine, sürfaktanın yapısına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Çok düşük yüzey gerilimine ulaşabilmek için kullanılacak olan sürfaktanların seçimi oldukça önemlidir.^{15, 22, 34}

Ayrıca, “Ouzo/Uzo” etkisi olarak adlandırılan bir teknikte emülsiyonların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Bu teknikte, kendiliğinden emülsifikasyon yöntemine kıyasla emülsiyon oluşumu çok daha hızlı gerçekleşir.⁴⁸ Sürfaktan kullanılmaz ve mekanik karıştırma yapılmaz.^{1, 48} S/Y ve Y/S emülsiyonları bu yöntemle hazırlanabilir. Y/S emülsiyonu için yağ çözen ve aynı zamanda su ile bütün oranlarda karışabilen uygun bir çözücü seçilir ve yağın bu çözücüde çözeltisi hazırlanır. Bu çözeltiliye suyun ilave edilmesiyle çözücü hızla su içine difüze olur ve yağ damlacıkları oluşur.⁴⁸ Su ile karışabilirliği yüksek çözücü kullanıldığında daha küçük damlacık boyutuna sahip emülsiyonlar hazırlanabilmektedir.⁴⁸ Sıcaklık, çözünün tipi, yağ:çözücü oranı ve yağın yoğunluğu (özellikle suya yakın olması istenmektedir) emülsifikasyon sürecini etkileyen ve bununla birlikte damlacık boyutu ve dağılımına etki eden faktörlerdir.⁴⁹

2004 yılında Bouchemal ve ark.⁵, üç aşamada yürütülen yeni bir kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi kullanmışlardır. Öncelikle, su ile karışabilen bir çözücü içinde yağ ve lipofilik sürfaktanın homojen bir çözeltisi hazırlanır. Diğer taraftan hidrofilik sürfaktan su içersinde çözülerek sulu faz hazırlanır. İkinci aşamada, hazırlanan organik faz sulu faza manyetik karıştırma altında enjekte edilir. Organik çözücünün dış sulu faza difüzyonu sonucunda nanodamlacıklar oluşur ve Y/S emülsiyonu elde edilir. Üçüncü aşamada ise organik çözücünün tamamı alçak basınç altında uzaklaştırılır.⁵ Çözücü difüzyon-buharlaştırma olarak da bilinen bu yöntemde emülsifikasyon oda sıcaklığında gerçekleştirilir ve üretim için basit bir karıştırma işlemi gerekir.^{1, 28}

2.1.5. Nanoemülsiyonların Kullanım Alanları

Nanoemülsiyonlar, küçük damlacık boyutları, kinetik stabiliteleri ve şeffaf görünüşleri nedeniyle gerek ilaç taşıyıcı sistem gerekse kozmetik amaçlı olarak kullanılmaktadır.^{7, 28} Etkin maddelerin biyoyararlanımını artırmak üzere farklı uygulama yollarına (oral, nazal, oküler, pulmoner, transdermal) yönelik olarak

nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmaktadır.^{7, 50} Suda çözünürlüğü düşük etkin maddelerin (diazepam, propofol vb.) i.v. olarak uygulanımı için Y/S nanoemülsiyonları ve ayrıca besleyici amaçlarla lesitin, vitamin, soya yağı vb. içeren parenteral nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Aynı zamanda, genetik yapıların taşınması ve gıda teknolojisinde de nanoemülsiyonlar kullanılmaktadır.⁷

- **Oral Nanoemülsiyonlar**

Nanoemülsiyonların, etkin maddeyi iç fazda hapsederek onu hidrolitik/enzimatik degradesyona, farklı pH koşullarına ve diğer çevresel koşullara karşı koruması, etkin madde biyoyararlanımını artırması gibi üstünlükleri olan sistemlerdir. Özellikle, lipofilik etkin maddelerin (antibiyotikler, hormonlar, steroidler, sitotoksik maddeler, diüretikler, antifungallar gibi) oral yolla verilmesi için ideal ilaç taşıyıcı sistemlerdir.³⁵

Zhang ve ark.⁵⁰, diyabet, kanser ve kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde önemli biyolojik etkileri olan pterostilbenin çözünürlük ve stabilite sorunlarını aşmak ve oral yolla kullanımını sağlamak üzere faz dönüşüm yöntemini kullanarak yaklaşık 58 nm damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyon formülasyonu hazırlamışlardır. Yapılan çalışmada, pterostilbenin çözünürlüğünde, stabilitesinde ve *in vitro* salım profilinde önemli derecede iyileştirme sağlanmıştır.

Gong ve ark.⁵¹, E vitamini içeren nanoemülsiyon formülasyonunu (ortalama damlacık boyutu 87.7 nm) hazırlayıp farmakokinetik parametreler (farmakokinetik çalışma sıçanlarda gerçekleştirilmiştir) açısından piyasadaki E vitamini içeren yumuşak kapsül preparatları ile karşılaştırdıklarında, nanoemülsiyon formülasyonu için daha küçük bir t_{max} ve daha yüksek bir C_{max} değeri elde edilmiş, eğri altında kalan alan da daha yüksek bulunmuştur. Antioksidatif etki açısından serumdaki ve karaciğer dokularındaki süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) seviyeleri değerlendirilmiş ve nanoemülsiyon formülasyonunun yumuşak kapsüllere göre daha

etkin olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, nanoemülsiyon formülasyonunun oral biyoyararlanımı artırdığı gösterilmiştir.

- *Parenteral Nanoemülsiyonlar*

Parenteral bir nanoemülsiyon formülasyonunun, farmakope kuralları gereğince, steril, izotonik, biyoparçalanabilir, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı olması gerekmektedir. Ayrıca, pirojen içermemeli ve toksik olmamalıdır.⁵²

Paklitaksel (PTX) kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve de suda çözünürlüğü düşük olan bir etkin maddedir. Piyasada bulunan ve Cremophor EL:etanol karışımındaki PTX çözeltisi olan “Taxol”ün neden olduğu ciddi yan etkiler (nefrotoksisite, nörotoksisite, hipotansiyon vb.) ve ayrıca, PTZ'nin albümin nanopartiküllerine yüklenmesi ile hazırlanan “Abraxane”ın yüksek üretim maliyeti, PTX için yeni formülasyonların geliştirilmesine neden olmaktadır.⁵³ Najlah ve ark.⁵³, piyasada bulunan ve parenteral beslenmede kullanılan “Intralipid” ve “Clinoleic” nanoemülsiyonlarını PTX için taşıyıcı olarak kullanmışlardır. Damlacık boyutu (PTX-“Clinoleic”: 264.7 nm; PTX-“Intralipid”: 294.6 nm), pH (PTX-“Clinoleic” pH: 7.1-7.5; PTX-“Intralipid” pH: 6.5-6.9), yükleme etkinliği (PTX-“Clinoleic”: %70.4-80.2; PTX-“Intralipid”: %44.2-57.4) açısından değerlendirilen nanoemülsiyonların PTX için uygun birer taşıyıcı sistem oldukları görülmüştür. Normal glial hücrelerde (SVG-P12) yapılan hücre kültürü çalışmasında, PTX içeren nanoemülsiyon formülasyonlarının, PTX çözeltisine göre daha az toksik olduğu bulunmuştur. Glioma hücreleri (U87-MG) kullanılarak yapılan sitotoksisite çalışmasında ise PTX-“Clinoleic” formülasyonunun PTX-“Intralipid” formülasyonuna göre daha sitotoksik olduğu saptanmış ve ayrıca, nanoemülsiyon formülasyonları için bulunan IC₅₀ değerlerinin PTX çözeltisi ile elde edilen IC₅₀ değerine göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, suda

çözünürlüğü düşük olan etkin maddeler için nanoemülsiyon formülasyonunun iyi bir taşıyıcı sistem olabileceği gösterilmiştir.

Diklofenak, NSAID türevi bir etkin madde olup uzun süreli olarak artrit tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Oral yolla uzun süreli kullanımında, gastrointestinal kanamaya, peptik ülser, kan diskrazisine ve anafilaksiye neden olmaktadır. Parenteral yolla uygulandığında ise enjeksiyon bölgesinde ağrı ve irritasyon oluşturmaktadır. Ayrıca, biyolojik yarı ömrünün oldukça kısa (1-2 saat) olması, bu nedenle sürekli etki elde etmek üzere uygulama sıklığının fazlalığı hastaya rahatsızlık vermekte ve hasta uyuncunu düşürmektedir.⁵⁴ Bu sorunu çözmek için gerçekleştirilen bir çalışmada, 200-240 nm aralığında damlacık boyutuna ve farklı zeta potansiyel değerlerine (-29.4 ve +62.1 mV) sahip, diklofenak içeren Y/S nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Sıçanlara iv olarak uygulanan formülasyonlar, ticari preparat "Voveran" [C_{max}: 4.22 µg/mL; AUC_{toplam}: 6.73 (µg/mL).saat; t_{1/2}: 1.14 saat ve ortalama kalış süresi (MRT) 2.09 saat] ile karşılaştırıldığında, nanoemülsiyon formülasyonlarının daha yüksek C_{max} (4.53-6.37 µg/mL) ve AUC [AUC_{toplam}: 9.36-21.6 (µg/mL).h] değerlerine sahip olduğu, ayrıca, elde edilen uzatılmış t_{1/2} ve MRT (5.89-6.25 saat) değerleri ile de etkin maddenin farmakokinetik profilinin iyileştirilmesinde nanoemülsiyonların faydalı olduğu gösterilmiştir.⁵⁴

- **Oküler Nanoemülsiyonlar**

Göz damlaları, kullanım kolaylığı ve üretim maliyetinin düşük olmasından dolayı göze topikal ilaç uygulanmasında en çok tercih edilen formülasyonlardır. Ancak, bu formülasyonların en önemli sakıncası, topikal uygulama sonrası gerek gözyaşı salgılanması gerekse nazolakrimal kanal yoluyla ilacın göz yüzeyinden birkaç dakika içinde uzaklaştırılması ve bu nedenle de etkin madde biyoyararlanımının oldukça düşük olmasıdır. Bundan dolayı, ilacın gözde kalış süresini artırmak üzere süspansiyon, jel ve

merhem gibi ilaç şekilleri hazırlanmıştır ancak bu ilaç şekilleri içinde bazı sakıncalar (görmede bulanıklık, düşük hasta uyuncu vb.) söz konusudur. Bu sakıncaların giderilmesi amacıyla, oküler uygulama için nanoemülsiyon formülasyonları da hazırlanmıştır.^{55,56} Ammar ve ark.⁵⁷ glokom tedavisinde kullanılan dorzolamid hidroklorürü içeren nanoemülsiyon formülasyonlarını hazırlayarak bu etkin maddeyi içeren piyasa preparatı (Trusopt®; viskozite artırıcı olarak hidroksietil selüloz içeren sulu çözelti, pH 5.65) ile karşılaştırmışlar ve normotansif albino tavşanlara her iki ilaç şeklini topikal olarak uyguladıklarında, nanoemülsiyonların daha yüksek bir etkinliğe sahip olduğunu ve aynı zamanda etki süresinin de uzadığını tespit etmişlerdir. Bu nanoemülsiyon formülasyonlarının glokom tedavisi için gerekli ilaç uygulama sıklığının azaltılması ve hasta uyuncunun artırılması açısından piyasa preparatına üstünlük sağlayacağı belirtilmiştir.⁵⁷

Pozitif yüklü emülsiyon formülasyonlarının, gözle temas ettiğinde meydana gelen elektrostatik etkileşim nedeniyle gözde kalış süresinin ve etkinliğinin arttığı gösterilmiştir.⁵⁸ Bu nedenle, son yıllarda, oküler uygulama için katyonik nanoemülsiyon formülasyonları oldukça ilgi çekmiş ve yapılan çalışmalarda, etkin maddelerin oküler biyoyararlanımının artırılmasında bu nanoemülsiyonların etkili olduğunu ortaya koymuştur.⁵⁹⁻⁶¹

- ***Topikal Nanoemülsiyonlar***

Topikal ilaç uygulanmasındaki en önemli sorun, deriden etkin madde penetrasyonunun sınırlı olması ve bu nedenle, etkinliğin düşük olmasıdır. Küçük damlacık boyutu, geniş yüzey alanı ve düşük yüzeyler arası gerilim gibi özellikleri ile nanoemülsiyonlar, etkin maddenin deriden penetrasyonunda artış sağlarlar. Nanoemülsiyonların topikal olarak uygulanmasını kolaylaştırmak ve cilt üzerinde kalış

süresini uzatmak üzere jelleştirici ajan kullanılarak nanoemülsiyon-bazlı jel formülasyonları da hazırlanmaktadır.^{7, 62}

Kaur ve ark.⁶³, sedef hastalığının topikal tedavisi için klobetazol propiyonat+kalsipotriol içeren nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon-bazlı jel formülasyonlarını hazırlamışlardır. Bu formülasyonların etkinliğini ise sedef hastalığı oluşturulmuş fareler üzerinde değerlendirmişlerdir. Sürekli bir etkin madde salım grafiği elde edilen nanoemülsiyon-bazlı jel formülasyonunun etkin madde penetrasyonunda artışa neden olduğu ve bundan dolayı saf etkin maddeye ve ticari preparatına göre daha yüksek antipsoriyatik aktivite gösterdiği saptanmıştır.

K1 vitamini, antikanserojen maddelerin kullanımına bağlı olarak deride oluşan istenmeyen yan etkilerin (örn: akne şeklinde döküntüler) önlenmesinde etkilidir ve K1 vitamini içeren kremler klinikte kullanılmaktadır.⁶⁴ Campani ve ark.⁶⁴, yarı katı formülasyonun kullanımındaki zorlukların giderilmesi ve aerosol şeklinde hastaya uygulanmasını sağlamak üzere K1 vitamini içeren nanoemülsiyon formülasyonları geliştirmişlerdir. Frans difüzyon hücreleri ve domuz kulağı derisi kullanılarak gerçekleştirilen penetrasyon çalışmasında, K1 vitamininin, nanoemülsiyon formülasyonları (yaklaşık ortalama damlacık boyutları:216-255 nm) kullanıldığında K1 çözeltisine göre epidermiste birikiminin önemli oranda (%1, %3 ve %5 oranında K1 vitamini içeren formülasyonlar için sırasıyla epidermiste saptanan K1 vitamini miktarları sırasıyla %19.6, 46.7 ve 55.6 ng/mg_{epidermis}) arttığı tespit edilmiştir. Aerosol şeklinde nanoemülsiyonların uygulanması ise bu birikim üzerinde pozitif etki yapmış ve %3 oranında K1 vitamini içeren formülasyon için epidermisteki K1 vitamini miktarı %18 oranında (72.8 ng/mg_{epidermis}) artış göstermiştir. ATR (“attenuated total reflectance”; azaltılmış toplam yansıma)-FT-IR (Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi) kullanılarak nanoemülsiyon formülasyonunun, derinin lipit yapısının

konformasyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı ve “stratum corneum”un ana bileşenlerini de önemli derecede etkilemediği gösterilmiştir. Çalışma sonucunda, geliştirilen nanoemülsiyon formülasyonunun K1 vitamini için uygun bir taşıyıcı sistem olduğu ve ticari bir ürün olarak geliştirilme potansiyeli olduğu bildirilmiştir.⁶⁴

Miastkowska ve ark.⁶⁵, akne tedavisi için hindistan cevizi yağı ve Tween 80 kullanarak izotretinoin içeren Y/S nanoemülsiyon formülasyonu geliştirmişlerdir. Nanoemülsiyondan etkin madde salımı sıfıncı derece kinetikle gerçekleşmiştir. Dolayısıyla, izotretinoinin formülasyondan kontrollü salımı sonucu uzatılmış bir dermatolojik etki elde edileceği, kullanım sıklığının ve olası yan etkilerin azalacağı belirtilmiştir.

Shakeel ve ark.⁶⁶, cilt kanserinde kullanmak üzere hazırladıkları 5-florourasil (5-FU) içeren nanoemülsiyon formülasyonları için sitotoksisite çalışmalarını insan malign melanoma (SK-MEL 5) hücrelerini kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Hücreler, 3.75-120 mM'a eşdeğer konsantrasyonlarda 5-FU içeren çözelti ve nanoemülsiyon formülasyonları ile muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda, melanoma hücrelerinin çözelti halindeki 5-FU'ya oldukça direnç gösterdiği ve bu nedenle önemli bir sitotoksik etki elde edilemediği bildirilmiştir. Nanoemülsiyon formülasyonunun ise sitotoksik etki açısından çözelteye göre çok daha etkili olduğu bulunmuştur (120 mM 5-FU konsantrasyonu için; çözelti halinde elde edilen % sitotoksisite 5.40 iken nanoemülsiyon formülasyonu için bu değer %60.6 olarak bulunmuştur). Cilt kanseri ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise, öncelikle, antineoplastik bir ajan olan dakarbazin içeren nanoemülsiyon formülasyonu geliştirilmiştir. Daha sonra, insan melanoma kanser hücreleri sc olarak farelere enjekte edilmiş ve farelerde kanser gelişimi sağlanmıştır. Tümör oluşturulan sıçanlara dakarbazin içeren nanoemülsiyon ve süspansiyon formülasyonları, 0.1 mg/kg dakarbazine eşdeğer dozda 40 gün boyunca

(her 2-3 günde bir defa olmak üzere) topikal veya im olarak uygulandığında her iki uygulama yolu içinde süspansiyona göre nanoemülsiyon formülasyonu tümörün küçültülmesinde daha etkin olduğu bulunmuştur. Topikal ve im uygulamalar sonrasında, nanoemülsiyon formülasyonu, tümör boyutunda sırasıyla, %49'luk ve %61'lik bir küçülme sağlarken süspansiyon formülasyonu ise sırasıyla sadece %4'lük ve %30'luk bir küçülme sağlamıştır.⁶⁷ Bu çalışmalar, nanoemülsiyon formülasyonlarının cilt kanseri tedavisi için önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

- ***Kozmetik/Kozmesötik Amaçla Nanoemülsiyon Kullanımı***

Çok küçük damlacık boyutu ile cilt üzerinde tekdüze dağılım göstermeleri, deriden su kaybını önlemeleri, geniş bir yüzey alanına sahip olmalarından dolayı aktif bileşiğin deriden penetrasyonunda artış sağlamaları, kinetik olarak kararlı olmaları gibi özelliklerinin yanısıra estetik açıdan da (şeffaf/yarı-şeffaf görünümü, düşük viskozite vb.) tercih edilmeleri ve ciltte hoş bir his bırakmaları nanoemülsiyonları kozmetik/kozmesötik amaçla kullanım açısından oldukça cazip kılmaktadır.^{68,69}

Quintão ve ark.⁷⁰, farmasötik ve kozmetik amaçlarla kullanılmak üzere antioksidan bileşiklerce zengin "*Vellozia squamata*" bitkisinin kök ve yapraklarından hareketle hazırlanmış oldukları hidroalkolik ekstreleri içeren topikal nanoemülsiyon formülasyonlarını faz dönüşüm yöntemini kullanarak hazırlamışlardır. Kök ve yaprak ekstrelerini içeren formülasyonlarının damlacık boyutları sırasıyla 148 ve 154 nm, pH değerleri ise 5.12 ve 4.95 olarak saptanmış ve ayrıca, pH değerlerinin 30 gün boyunca, damlacık boyutlarının ise 7 gün boyunca anlamlı bir değişim göstermeden korunduğu gösterilmiştir. Benzer bir çalışmada ise antioksidan bileşikler bakımından zengin olan "*Phyllanthus urinaria*" bitkisinin etanol ekstresi için deri yaşlanmasına karşı kullanılmak üzere nanoemülsiyon formülasyonları (ortalama damlacık boyutları: ~31

and 36 nm) geliştirilmiştir. Bu formülasyonların antioksidan aktivitelerini saptamak üzere 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü etkileri incelenmiş ve yaklaşık %30 olarak saptanmıştır.⁷¹

Güneş ışınlarına karşı fiziksel koruma sağlayan titanyum dioksit (TiO₂) partiküllerini ve kimyasal koruyucu olarak da oktil metoksisinnamat (OM) maddesini birarada içeren nanoemülsiyon formülasyonu avokado yağı kullanılarak Silva ve ark.⁷² tarafından hazırlanmıştır. Nanoemülsiyon stabilitesi etkilenmeden %1 a/a OM ve %0.25 a/a TiO₂ içeren formülasyon başarıyla hazırlanmıştır. TiO₂ varlığında/yokluğunda %1 OM içeren formülasyondan OM salımının 4 saat süreyle yavaş bir şekilde gerçekleştiği ve ayrıca, formülasyona % 0.25 TiO₂'nin ilavesinin güneşten koruma faktörü (SPF) üzerinde önemli bir etki oluşturmadığı, bu nedenle, SPF'yi arttırmak üzere daha yüksek miktarlarda fiziksel koruyucu ilavesini sağlamak için dış faz viskozitesinin artırılması gerektiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, iç fazda daha fazla OM ve dış fazda ise daha yüksek miktarda TiO₂ içerecek şekilde formülasyonun yeniden tasarlanmasının uygun olacağı raporlanmıştır.⁷² OM için farklı taşıyıcı sistemlerin (nanokapsül, nanoemülsiyon ve konvansiyonel emülsiyon) hazırlandığı başka bir çalışmada, deriden en yüksek OM penetrasyonu nanoemülsiyon formülasyonu kullanıldığında elde edilmiştir.⁷³

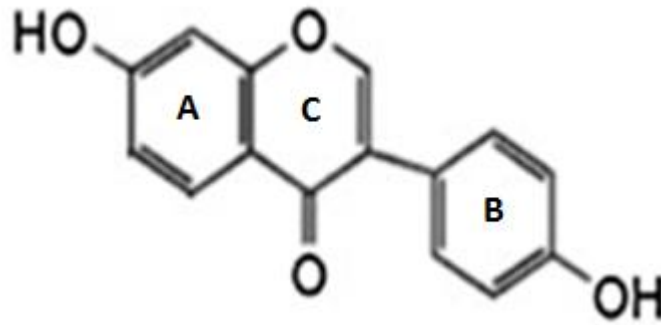
“*Agave sisalana*”, yapraklarından elde edilen lif nedeniyle ağ ve halat imalatı için yetiştirilmektedir. Lif imalatı sırasında yaprakların yaklaşık %40'mın atıl hale gelmesi çevre kirliliğine neden olmaktadır.⁷⁴ Barreto ve ark.⁷⁴, hem bu atıl ürünü değerlendirerek çevre kirliliğini azaltmak hem de ürünün içindeki polisakkaritlerin nemlendirici özelliklerinden faydalanmak üzere nanoemülsiyon formülasyonlarını hazırlamışlardır. Uygun pH ve küçük damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyonların 90 gün boyunca stabilitelerini korudukları görülmüştür. Yapılan in vivo çalışmayla da, formülasyonların irritasyona neden olmadığı saptanmış, tek bir uygulama sonrası

bariyer fonksiyonun 5 saat boyunca korunması ve “stratum corneum” tabakasının su içeriğinin artırılması sonucu formülasyonların nemlendirici özelliklerini gösterdikleri belirtilmiştir.⁷⁴

2.2. Daidzein (DZ)

2.2.1. Fizikokimyasal Özellikleri

Flavonoidler bitkilerde bulunan ve kimyasal yapılarına göre flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, kateşinler şeklinde sınıflandırılabilen doğal bileşiklerdir. İzoflavonların temel yapısı, bir heterosiklik halka olan C'ye bağlı iki benzen halkasından (A ve B) oluşan bir flavon çekirdeği ile karakterizedir (Şekil 2.4).⁷⁵ Difenolik yapıdaki izoflavonların biyolojik etkileri, A ve B halkalarında bulunan -OH ve C halkasında bulunan C=O gruplarından güçlü bir şekilde etkilenmektedir.⁷⁶ DZ, aglikon yapıda bir izoflavondur. Antioksidan aktivite için “*Leguminosae*” familyasına ait DZ (7-hidroksi-3-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on; 4',7-dihidroksiizoflavon), A ve B halkalarındaki -OH gruplarından dolayı hidrojen verip redoks reaksiyonlarına girerek serbest radikalleri yok edebilir. C halkası ve çoklu doymamış bağlardan dolayı da dayanıklı bir kimyasal yapı oluştururlar. Yapısal grupları aracılığıyla metal şelasyonu yaparak ROS oluşumunu engelleyebilir.^{77,78}



Şekil 2.4. DZ'nin kimyasal yapısı⁷⁵

DZ, beyaz/kırık beyaz renkli bir tozdur. Molekül ağırlığı 254.2 g/mol ve moleküler formülü ise C₁₅H₁₀O₄ olan fitoöstrojenik bir bileşiktir.⁷⁹⁻⁸²

Farklı üretici firmalar tarafından daidzein için verilen çözünürlük bilgileri aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- a.** DZ, dimetilsülfoksit (DMSO), etanol ve dimetilformamid gibi organik çözücülerde çözünür. Sırasıyla, bu çözücülerdeki çözünürlüğü 30 mg/mL, 0.1 mg/mL ve 10 mg/mL'dir. Daidzein sulu tamponlarda zor çözünür (30-100 mL, USP 30/NF25). Sulu tamponlarda maksimum çözünürlüğü için daidzein ilk olarak DMSO içerisinde çözülmeli ve daha sonra seçilen sulu tampon ile dilüe edilmelidir. Daidzeinin DMSO:PBS (pH 7.2) 1:10 karışımındaki çözünürlüğü yaklaşık 0.15 mg/mL'dir. Hazırlanan bu sulu çözeltinin bir günden fazla saklanması önerilmemektedir.⁸³
- b.** DZ, DMSO içerisinde çözünür (9.8-10.20 mg/mL). Berrak ile çok hafif bulanık aralığında, renksizden hafif sarıya kadar değişebilen özelliklerde çözeltileri hazırlanabilmektedir.⁸²
- c.** DZ, DMSO içerisinde çözünür (~33.3 mg/mL), diğer çözücülerde ise çok düşük çözünürlüğe sahiptir.⁸¹ DZ için verilen erime noktası değerleri ise 332.5-336 °C⁸¹, ~338° C⁸⁴, 320-323 °C⁸⁵ şeklinde özetlenebilir. DZ, ≤ -20 °C'de saklanmalıdır.^{81,82}

Nan ve ark.⁸⁵ farklı çözücülerde DZ çözünürlüğünü ve ayrışma sabitlerini belirlemek üzere bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çözünürlük çalışması su, metanol, triklorometan, etil etanoat, propanon ve hekzan gibi çözücülerde yapılmıştır. Katı-sıvı arasında denge kurulması için hazırlanan örnekler çözücü tipine bağlı olarak farklı sürelerde (su ve metanol için 3 saat, aseton 3.5 saat, triklorometan (kloroform), hekzan ve etil etanoat (etil asetat) için ise sırasıyla 5, 5.5 ve 6 saat) devamlı karıştırılmıştır. Çözünürlük çalışması farklı sıcaklıklarda (15-55 °C) gerçekleştirilmiş ve sıcaklık artışı ile DZ'nin çözünürlüğünün arttığı, çalışılan tüm sıcaklıklar için DZ'nin çözünürlüğü

kullanılan çözücüler açısından büyükten küçüğe göre propanon>metanol>etil etanoat>hekzan > triklorometan > su olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, DZ'nin su (polaritesi en yüksek) ve hekzan (en düşük polariteye sahip) içerisindeki düşük çözünürlüğü yapısındaki gruplardan (aromatik zincirler sudaki çözünürlüğü, fenolik hidroksil grupları ise apolar çözücülerde çözünürlüğü azaltmaktadır) ileri geldiği ve gerek polar gerekse apolar çözücülerde zayıf bir çözünürlüğe sahip olduğu saptanmıştır. Ayırma sabitinin belirlenmesi içinse DZ metanol (1 mg/mL) içerisinde çözündürülmüş ve daha sonra 50 µL'si alınarak 10 mL "Britton-Robinson" tampon çözeltisine (pH 2-12) ilave edilmiştir. DZ'nin yapısında bulunan iki fenolik hidroksil grubundan dolayı ortama proton verdiği ve diprotik asit olarak tanımlanabileceği raporlanmıştır. DZ için pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin sırasıyla 7.51 ± 0.07 ve 9.47 ± 0.14 olarak saptandığı bildirilmiştir.⁸⁵ Benzer sonuçlar, farklı gruplar tarafından yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir.^{86,87}

Kitagawa ve ark.⁸⁸ tarafından DZ içeren mikroemülsiyon formülasyonları, su fazı olarak 150 mM NaCl çözeltisi, yağ fazı olarak izopropil miristat (IPM), sürfaktan ve ko-sürfaktan olarak da sırasıyla Tween 80 ve etanol kullanılmıştır. IPM:NaCl çözeltisi:Tween 80:etanol ağırlık oranları Y/S mikroemülsiyonu için sırasıyla 8:25:20:47; S/Y mikroemülsiyonu içinse 33:7:30:30 olarak çalışılmış ve formülasyonlar hazırlanmıştır. Çözünürlük çalışmaları IPM ve 150 mM NaCl ortamlarında ve her bir mikroemülsiyon formülasyonunda gerçekleştirilmiştir. DZ'nin 150 mM NaCl çözeltisinde ve IPM'de ki çözünürlüğünün düşük olduğu (sırasıyla 0.029 mM ve 0.072 mM), mikroemülsiyon formülasyonlarının ise DZ çözünürlüğünü artırdığı, Y/S mikroemülsiyonu ve S/Y mikroemülsiyonu için elde edilen çözünürlük değerlerinin ise sırasıyla 11.46 mM ve 18.53 mM olduğu tespit edilmiştir. S/Y mikroemülsiyonunun çözünürlük açısından daha faydalı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, DZ'nin partiyon

katsayısı tayini, 0.1-1.0 mM konsantrasyon aralığında DZ içerecek şekilde hazırlanmış PBS:n-octanol (1:1 v/v) karışımlarında çalışılmış (37 °C’de ve 18 saat karıştırma ve ilave 1 saat daha bekletme ile) ve bekletme süresi sonrasında gerek PBS fazındaki gerekse n-oktanol fazındaki DZ içeriği HPLC kullanılarak saptanmıştır. DZ’nin partiyon katsayısı (n-oktanol/PBS) 1.93 olarak saptanmıştır.⁸⁸ DZ’nin intradermal taşınımını tespit etmek üzere ise Franz tipi difüzyon hücreleri ve domuz derisi kullanılarak çalışma 37 °C’de, donör kompartmanına mikroemülsiyon ve reseptör kompartmanına da PBS konularak gerçekleştirilmiştir. Y/S mikroemülsiyonu için sonuç verilmezken 150 mM NaCl çözeltisi, IPM ve S/Y mikroemülsiyonu içinse derideki DZ miktarı sırasıyla, 0.37 $\mu\text{mol/g}_{\text{deri}}$, 0.26 $\mu\text{mol/g}_{\text{deri}}$ ve 2.29 $\mu\text{mol/g}_{\text{deri}}$ olarak raporlanmıştır.⁸⁸

Shen ve ark.⁸⁹ tarafından sudaki çözünürlüğü düşük olan DZ’nin oral biyoyararlanımını artırmak üzere kendiliğinden mikro-emülsifiye olabilen sistemler (SMEDDS) geliştirilmiştir. Bu amaçla, öncelikle, su, farklı yağlar, sürfaktanlar ve ko-sürfaktanlar kullanılarak çözünürlük çalışması (ultrasonik banyo içerisinde 40 °C’de 20 dakika bekletme sonrası, 25 °C’de 48 saat karıştırma ile) gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda, DZ’nin su, IPM, hint yağı, oleik asit, etil oleat, Tween 80, Cremophor EL, Cremophor RH40, etanol, propilen glikol (PG) ve PEG 400 içerisindeki çözünürlükleri sırasıyla 8.215×10^{-3} mg/mL, 0.121 mg/mL, 0.598 mg/mL, 1.253 mg/mL, 2.327 mg/mL, 5.102 mg/mL, 7.580 mg/mL, 9.882 mg/mL, 4.852 mg/mL, 3.147 mg/mL ve 8.403 mg/mL olarak belirlenmiştir. Çözünme testi de bu çalışma kapsamında 900 mL fosfat tamponu (PB) pH 6.8 ve 0.1 mol/L HCl ortamlarında 37 °C ve 50 rpm’de gerçekleştirilmiştir. PB pH 6.8 ve HCl ortamlarında 30 dakika içerisinde elde edilen % kümülatif çözünen DZ, sırasıyla %81.2 ve %80.3 olarak saptanmıştır.

Yang ve ark.⁹⁰ ise DZ'nin absolü etanol, saf su ve etanol:su ortamlarındaki çözünürlüğünü farklı sıcaklıklarda UV spektrofotometrik yöntem (256 nm) kullanarak saptamışlardır. DZ çözeltileri 2.5 saatlik karıştırılma sonrasında 2 saat daha karıştırılmadan bekletilerek hazırlanmıştır. Bekletilme sonrası üst kısımdaki sıvı alınarak süzölmüş, miktar tayini gerçekleştirilmiş ve hesaplanan çözünürlük değerleri Tablo 2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2. Farklı sıcaklıklarda, DZ'nin su, etanol ve etanol:su karışımlarındaki çözünürlük değerleri⁹⁰

Çözücü/çözücü karışımı	Sıcaklık (°C)	Çözünürlük (µg/mL)
Saf su	25	1.3
Saf su	35	3
%20 etanol-su karışımı (h/h)	25	3.3
%20 etanol-su karışımı (h/h)	35	9.90
%40 etanol-su karışımı (h/h)	25	46
%40 etanol-su karışımı (h/h)	35	63.5
%60 etanol-su karışımı (h/h)	25	441
%60 etanol-su karışımı (h/h)	35	522
%80 etanol-su karışımı (h/h)	25	1030
%80 etanol-su karışımı (h/h)	35	1320
Absolü etanol	25	1250
Absolü etanol	35	1500

Zeng ve ark.⁹¹ ise yaptıkları çalışmada farklı sıcaklıklarda, DZ'nin saf su, PG (%99.8 saflıkta) ve farklı oranlardaki PG:su karışımlarındaki çözünürlüğünü incelemiştirler. Bu amaçla, DZ çözücü/çözücü karışımlarına ilave edilmiş, farklı sıcaklıklarda en az 5 gün (sabit konsantrasyona ulaşmaya kadar) dengelenmesi için bekletilmiş ve sonrasında ise süzölerek elde edilen süzöntü metanol ile seyreltilmiştir.

Miktar tayini UV spektrofotometre (254 nm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hesaplanan çözünürlük değerleri Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Farklı sıcaklıklarda, DZ'nin su, PG ve PG:su karışımlarındaki çözünürlük değerleri⁹¹

Çözücü/çözücü karışımı	Sıcaklık (°C)	Çözünürlük (µg/mL)
Saf su	25	1.8
	35	3.6
PG:Su (1:9)	25	2.8
	35	5.3
PG:Su (2:8)	25	4.3
	35	9.1
PG:Su (3:7)	25	10.1
	35	19.4
PG:Su (4:6)	25	25.0
	35	48.0
PG:Su (5:5)	25	62.0
	35	103.2
PG:Su (6:4)	25	140.8
	35	219.4
PG:Su (7:3)	25	300.0
	35	455.0
PG:Su (8:2)	25	518.5
	35	729.6
PG:Su (9:1)	25	810.9
	35	1130
PG	25	1160
	35	1550

Zhao ve ark.⁹² DZ'nin sudaki çözünürlüğünün artırmak üzere poliamido amin (G3 PAMAM) ve polipropilen imin (G4 PPI) dendrimerleri ile DZ'nin inklüzyon komplekslerini hazırlamışlardır. DZ'nin sudaki düşük çözünürlüğünün (1.17 µg/mL) G3 PAMAM ve G4 PPI dendrimerleri varlığında önemli ölçüde arttığı (sırasıyla, 186 ve 650 kat) ve dendrimer konsantrasyonu artışı ile DZ çözünürlüğünün lineer olarak artarak değiştiği raporlanmıştır.

Farklı ortamlar için saptanan DZ çözünürlük değerleri Tablo 2.4'de özetlenmiştir.



Tablo 2.4. DZ'nin farklı çözücülerdeki çözünürlük bilgileri.

Çözücü	Çözünürlük (µg/mL)	Deneyin yapıldığı koşullar	Kaynak
Saf su	8.215	40 °C'de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25°C 48 saat karıştırma	89
	3.84	25 °C'de 48 saat çalkalama	93
	13	32 °C'de en az 48 saat bekletme (kuru ekstreden hareketle çalışılmış)	94
	1.8	25 °C'de en az 5 gün bekletme	91
	3.6	35 °C'de en az 5 gün bekletme	91
	1.3	2 °C'de 3 saat karıştırma	85
	3	35 °C'de 3 saat karıştırma	85
Asidik su	7.853	40 °C'de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
IPM	121	40 °C'de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
	18,3	37 °C'de 20 saat karıştırma	88
Hint yağı	598	40 °C'de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
Oleik asit	1253	40 °C'de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
	1	32 °C'de en az 48 saat bekletme (kuru ekstreden hareketle çalışılmış)	94

Tablo 2.4. (Devamı)

Etil oleat	2327	40 °C’de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
Tween 80	5102	40 °C’de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
Cremophor EL	7580	40 °C’de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
Cremophor RH40	9882	40 °C’de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
Absolü Etanol	4852	40 °C’de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
	1250	25 °C’de 2.5 saat karıştırma ve sonrasında 2 saat bekletme	90
	1500	35 °C’de 2.5 saat karıştırma ve sonrasında 2 saat bekletme	90
Etanol	100		83
PG	3147	40 °C’de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
	2610	32 °C’de en az 48 saat bekletme (kuru ekstreden hareketle çalışılmış)	94
	1160	25 °C’de en az 5 gün bekletme	91
	1550	35 °C’de en az 5 gün bekletme	91

Tablo 2.4. (Devamı)

PEG 400	8403	40 °C'de 20 dakika ultrasonik banyoda bekletme, 25 °C 48 saat karıştırma	89
	8530	32 °C'de en az 48 saat bekletme (kuru ekstreden hareketle çalışılmış)	94
150 mM NaCl çözeltisi	7.37	37 °C'de 20 saat karıştırma	88
%2 PVA çözeltisi	9.75	25 °C'de 48 saat çalkalama	93
Kloroform	0.44	25 °C'de 48 saat çalkalama	93
	5.87	25 °C'de 5 saat karıştırma	85
	8.99	35 °C'de 5 saat karıştırma	85
Diklorometan (DCM)	1.49 (DZ olarak)	25 °C'de 48 saat çalkalama	93
	828.74 (DZ-fosfolipid kompleksi halinde)		
	757.92 (DZ-siklodekstrin inklüzyon kompleksi halinde)		
Labrasol®	5730	32 °C'de en az 48 saat bekletme (kuru ekstreden hareketle çalışılmış)	94
Transcutol®	6860	32 °C'de en az 48 saat bekletme (kuru ekstreden hareketle çalışılmış)	94
PBS pH 7.4	16.22		95
DMSO	30000		83
Dimetilformamid	10000		83

Tablo 2.4. (Devamı)

DMSO: PBS (pH 7.2) (1:10)	150		83
pH 6 tamponu	4.77	37 °C’de 24 saat karıştırma	84
pH 10.8 tamponu	476.9	37 °C’de 24 saat karıştırma	84
Soya yağı	2.77	37 °C’de 24 saat karıştırma	84
% 3 sodyum lauril sülfat sulu çözeltisi	250	37 °C, 150 rpm, 24 saat (soya fasülyesi ekstresinden hareketle)	96
Metanol	1200	25°C’de 3 saat karıştırma	85
	1920	35 °C’de 3 saat karıştırma	85
Etil asetat	215	25 °C’de 6 saat karıştırma	85
	302	35 °C’de 6 saat karıştırma	85
Hekzan	5540	25 °C’de 5.5 saat karıştırma	85
	7690	35 °C’de 5.5 saat karıştırma	85
Aseton	28600	25 °C’de 3.5 saat karıştırma	85
	34200	35 °C’de 3.5 saat karıştırma	85

2.2.2. Farmakolojik Özellikleri

Flavonoidler insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan doğal polifenolik bileşiklerdir. Antioksidan ve antiproliferatif fonksiyonlarına bağlı olarak apoptozisi indükleyici, hücre farklılaşmasını ve hücre döngüsünü modüle edici etkileri vardır. Sahip oldukları antioksidan aktivite, serbest radikallerin sebep olduğu DNA hasarını önlemekte ve böylece kanserin başlangıç aşaması bloke edilebilmektedir.⁹⁷ Ayrıca, kardiyovasküler hastalık riskini azalttıkları da bilinmektedir.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Soya fasülyesi ve soya ürünlerinde yoğun olarak bulunan izoflavonların dört temel yapısı (aglikon (daidzein, genistein); glikozit, malonil glikozit veya asetil glikozit) vardır.

İzoflavonlar, 17- β -östradiol ile kimyasal yapı benzerliği nedeniyle östrojenik aktiviteye sahiptirler ve biyolojik etkilerinin çoğu östrojen-reseptör (ER) sinyal yollarının modülasyonu ile gerçekleşir.^{98,101-104} Ayrıca östrojen metabolizmasında rol oynayan bazı enzimlerin etkinliğini değiştirebilirler.¹⁰¹ Hormon-bağımlı dokularda, östrojen, hücre çoğalması, farklılaşması veya apoptoz gibi birçok fizyolojik süreçte önemli bir rol oynar. Bununla birlikte, yüksek östrojen seviyeleri ise meme veya prostat kanseri gibi hormon-bağımlı hastalıkların gelişiminde büyük bir risk faktörüdür.¹⁰⁴ İzoflavonların, tirozin protein kinaz, mitojenle-etkinleşen proteinkinaz veya DNA topoizomeras II gibi çeşitli enzimlerin aktivitesini inhibe ederek hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve apoptozu tetiklediği gösterilmiştir.¹⁰⁴ Bunlara ek olarak, izoflavonlar, antioksidan savunmayı ve DNA onarımını artırır. Tümör anjiyogenezini ve metastaz gelişimini inhibe eder ve diğer ER-bağımsız sinyal iletim yollarını da etkiler.¹⁰⁴

Flavonoidlerin, antikanserojen olarak başlıca moleküler etki mekanizmaları, mutant p53 proteininin down-regülasyonu, hücre döngüsünün durdurulması, tirozin kinaz inhibisyonu, ısı şok proteinlerinin inhibisyonu (bu proteinler metastatik gen ekspresyonunun hızlandırılması, immün sistemin aktivasyonu, hücre yaşlanması ve

apoptoz gibi antikanser mekanizmaların baskılanması gibi mekanizmalarla kanser gelişiminde etkili olmaktadır. Bu nedenle, kansere özgü proteinlerin ısı şok protein inhibitörleri tarafından hedef alınması ve otonom büyümenin inhibe edilmesi kanser tedavisinde önemli bir yer tutmuştur), östrojen reseptörüne bağlanma kapasitesi, Ras proteinlerinin ekspresyonunun inhibisyonu şeklinde özetlenebilir.^{105, 106}

Cildin UV ışınlarından kaynaklanabilecek zararlı etkilere karşı korunması (“photoaging”, ışık etkisiyle yaşlanma; yüzdeki yaşlanmanın yaklaşık %80-90’ı UV kaynaklıdır), cilt kanserinin önlenmesi ve cilt bakımı gibi amaçlarla flavonoidlerin topikal olarak uygulanmasına yönelik çalışmalar da yapılmıştır.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ Ancak birçok polifenolik bileşiğin transdermal olarak taşınımı onların hem sulu hem de organik ortamlardaki düşük çözünürlüklerinden ve düşük permeabilitelerinden dolayı yetersizdir. Bundan dolayı, farklı ilaç taşıyıcı sistemler (lipozom, mikroemülsiyon, nanoemülsiyon vb.) geliştirilmiş ve çeşitli polifenolik bileşiklerin intradermal taşınımı sağlanmıştır.^{88, 110, 111}

DZ, fitoöstrojenik bir bileşik olarak östrojen reseptörlerine bağlanır. Bununla birlikte, DZ’nin antiinflamatuvar, kuvvetli antioksidan, enzim inhibitörü özellikleri vardır ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) kolesterol düzeylerini düşürmektedir. Ayrıca, sitokinleri, hücre adezyon proteinlerini ve platelet agregasyonunu inhibe eder ve nitrik oksit üretimini ise indükler.^{93, 98, 112} DZ’nin insan sağlığı açısından çok çeşitli faydalarının (kardiyovasküler hastalıklar ve kanserin önlenmesi-tedavisi, östrojen takviyesi tedavisi için bir alternatif olması, menopoz sonrası kemik kaybı olan kadınlarda osteoporozun önlenmesi-tedavisi, diyabetin önlenmesi vb) olduğu raporlanmaktadır.^{93, 95, 113-116} Daha önceki çalışmalarda, DZ’nin hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden genlerin modülasyonu yoluyla kanser hücrelerinin büyümesini

inhibe ettiği ve osteoblast hücrelerinin ise çoğalmasını sağladığı raporlanmıştır.^{95, 98, 117,}

118

İzoflavonlardan olan genistein ile ilgili yapılmış bazı nanoemülsiyon çalışmaları mevcuttur. Ancak, DZ içeren nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı-jel formülasyonları ile ilgili bir makale bulunamamıştır. Genistein ile ilgili yapılan bir çalışmada, genisteinin transdermal taşınması amacıyla nanoemülsiyon formülasyonu hazırlanmış ve *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Hazırlama sırasında farklı yağlar (oleik asit, labrafac WL1349), Cremophor EL, Cremophor RH 40, Tween 80 ve etanol kullanılmıştır. Franz difüzyon hücreleri kullanılarak permeabilite çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak, genisteinin transdermal taşınması için oleik asit ve Cremophor EL kullanılarak hazırlanan formülasyonun en uygun formülasyon olduğu tespit edilmiştir.¹¹¹ Diğer bir çalışmada ise genistein nanoemülsiyonlarını içeren topikal jel formülasyonu hazırlanmıştır ve orta zincirli trigliseridlerle çalışıldığında deriye uygulama açısından daha iyi sonuçlar elde edildiği vurgulanmıştır.¹¹⁹

DZ'nin ve 7,3',4'-trihidroksiizoflavonun (DZ'nin ana metaboliti) melanoma olmayan cilt kanseri üzerindeki etkileri ile ilgili yapılan bir çalışmada, bu bileşiklerin UVB-indüklenmiş cilt kanseri üzerindeki koruyucu etkilerinin az bilindiği vurgulanmış ve çalışma sonucunda, söz konusu metabolitin UVB-indüklenmiş COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiği saptanarak cilt kanserine karşı potansiyel koruyucu bir madde olabileceği ifade edilmiştir.¹²⁰ Bununla birlikte, diğer bir çalışmada, formülasyon hazırlanmaksızın sadece DZ ve genistein maddelerinin melanoma cilt kanseri üzerindeki etkileri incelenmiş, DZ'nin S fazında hücre sayısını artırdığı, G(1) fazında ise hücre sayısını azalttığı bulunmuştur. Her iki izoflavonun farklı mekanizmalarla da olsa melanoma oluşumunu inhibe ettikleri saptanmış ve melanoma tedavisinde kullanım potansiyelleri olduğu vurgulanmıştır.¹²¹

Genellikle oral yolla kullanılan DZ süspansiyon halinde sıçanlara uygulandığında %6.1'lik bir mutlak oral biyoyararlanıma sahip olduğu raporlanmıştır.⁹³ Bu düşük biyoyararlanım, DZ'nin fizikokimyasal özelliklerinin (düşük çözünürlük, düşük oral biyoyararlanımı vb.) ve uğradığı yoğun metabolizasyonun (karaciğer ve bağırsakda) sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, DZ'nin hastalıkların önlenmesi ve tedavisine yönelik farklı yollarla uygulanabilmesi, biyoyararlanımının artırılması, sürekli salımının sağlanabilmesi amacıyla ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi düşünülmüş ve bununla ilgili çalışmalar yapılmıştır.^{84, 93, 113, 114, 116, 122} Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki çalışmalara ilgi çok artmıştır. Nanotaşıyıcılar flavonoidlerin düşük çözünürlük, kısa yarı ömür ve düşük biyoyararlanım gibi problemlerinin üstesinden gelinmesi için uygun sistemlerdir. Bu nanotaşıyıcılar arasında lipozomlar, katı lipid nanopartikülleri, PEG-katı lipit nanopartikülleri, PEG-lipozomlar, PLGA ve kitosan nanopartikülleri, kendiliğinden emülsifiye olabilen sistemler, nanoemülsiyonlar yer almaktadır. Ancak, flavonoidlerle ilgili yapılan bu çalışmalar yeterli değildir.^{88, 93, 108, 113-116}

2.3. Cilt Kanseri

Dünya genelinde en yaygın görülen kanserlerden birisi olan cilt kanseri dünya nüfusunun yaklaşık % 20'sini etkilemektedir.¹²³ Primer cilt kanserleri, köken aldıkları hücrelere göre adlandırılmakta ve genel olarak melanoma ve melanoma-olmayan (bazal hücreli karsinom, skuamöz hücreli karsinom) cilt kanseri şeklinde sınıflandırılmaktadır.¹²⁴ Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünya çapında her yıl 2-3 milyon melanoma olmayan ve 132000 de melanoma vakası görülmektedir. Cilt Kanseri Vakfı istatistiklerine göre teşhis konulan her üç kanser vakasından birisi cilt kanseridir, ayrıca, her beş Amerikalıdan birinde cilt kanseri görülme olasılığı olduğu raporlanmıştır.¹²⁵ Cilt kanseri nedeniyle dünya çapında her yıl tahminen 60000 ölümün

gerçekleştiği, bu ölümlerin çoğunluğunun (~48000) malign melanomadan kaynaklandığı, yaklaşık 12000 ölümün ise melanoma olmayan cilt kanserlerinden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Cilt kanserlerinde en önemli risk faktörü UV ışınlarıdır. Özellikle, ozonun koruyucu etkisinin azalması, insanların yaşam sürelerinin uzaması ve bronzlaşma alışkanlığının artması cilt kanseri görülme riskini önemli derecede artırmıştır.^{125, 126} DSÖ tarafından ozondaki %10'luk azalmanın 300000 civarında melanoma olmayan ve 4500 civarında ise melanoma cilt kanseri vakasında artışa neden olabileceği tahmini yapılmış ve dünya çapında melanoma insidansının artmaya devam ettiği bildirilmiştir.¹²⁵

Melanoma, deriye renk veren melaninin üretiminden sorumlu melanosit hücrelerinin veya ben (nevüs) hücrelerinin kanseridir.^{127,128} Görülen melanoma vakalarının çoğu normal deri üzerinde gelişmekte, %26'sı ise daha önce var olan/sonradan oluşan benlerden kaynaklanmaktadır.¹²⁹ Kanser, deri üzerinde pigmentasyon ile veya mevcut bende rengin koyulaşması ile başlamaktadır. Başlangıç aşamasında, lezyonlar nodüller veya plaklar şeklinde görülebilmektedir. Zamanla, lenfatik yayılma meydana gelmekte ve ana tümör çevresinde lezyonlar oluşmaktadır.¹³⁰ Genel olarak asimetri, renk değişikliği, düzensiz sınırlar ve çapın 6 mm'den daha büyük olması gibi klinik özellikler melanomaya işaret etmekle birlikte istisnalar da görülmektedir.¹³¹ Yapılan çalışmalar, melanomanın en çok (azalan sıralama ile) gövde, alt ekstremitte, üst ekstremitte ve baş-boyun bölgesinde ortaya çıktığını göstermiştir.^{131, 132} Cinsiyet açısından ele alındığında, melanomanın kadınlarda en çok alt ekstremitede, erkeklerde ise gövdede görüldüğü tespit edilmiştir.^{128, 133} Cinsiyetler arasında görülen bu fark üzerinde saç kesimi, giyim tarzı, meslek ve güneş ışınlarına maruziyeti belirleyen faktörlerin de etkili olduğu belirtilmektedir.¹³⁴ Melanoma açısından, mortalite oranları incelendiğinde ise son 25 yılda genel olarak önemli bir artış görülmekte ve

insidansın aksine ölüm vakaları erkek melanoma hastalarında (özellikle 65 yaş üzeri hastalarda) daha fazla (kadın hastaların 2 katı) görülmektedir. Tümörlerin, genellikle erkeklerde sırt gibi görülmesi zor olan bölgelerde oluşması sonucu tanının gecikmesi buna neden olan faktörlerden birisi olarak gösterilmektedir.¹³⁵ Hormonal faktörlerde melanoma gelişiminde rol oynamaktadır.¹²⁸ Östrojen reseptör β protein seviyesinin tümör kalınlığı üzerine etkili olduğu, protein seviyesindeki azalmanın tümör kalınlığında artışa ve metastaza neden olduğu bildirilmiştir.¹³⁴

Risk Faktörleri

Melanoma gelişiminde çevresel (eksojen) ve endojen faktörlerin kompleks bir etkileşimi söz konusudur. Bu risk faktörleri içerisinde ilk sırayı UV ışınları almaktadır.¹³¹ Güneşe maruziyet aralıklı, kronik ve toplam maruziyet olarak incelenmektedir. Aralıklı maruziyet, belirli bir aktivite sırasında (güneşlenmek, su sporu yapmak veya güneşli yerlerde tatile gitmek gibi) yoğun olarak güneş ışınlarına maruz kalmaktır. Kronik maruziyet ise sürekli olarak güneş ışınlarına maruz kalmayı (genellikle iş dolayısıyla) ifade etmektedir. Toplam maruziyet ise aralıklı ve kronik maruziyeti kapsamaktadır.¹³⁶ Güneş ışınlarına kronik maruziyetin melanoma üzerindeki etkisi karmaşık ve tartışmalıdır.¹³¹ Ciddi cilt yanıkları oluşmadığı müddetçe, kronik maruziyet sonrası, melanizasyonun artmasının ve epidermal kalınlaşmanın koruyucu bir etki oluşturduğu ancak yoğun maruziyetin DNA hasarına ve immunosupresyona neden olduğu da bilinmektedir.¹³⁷ Güneşe aralıklı ve yoğun bir şekilde maruziyetin ise melanoma gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğu bildirilmiştir.^{131, 136, 138} Gandini ve ark.¹³⁶ güneş ışınlarına maruziyetin olası riskleri hakkında Eylül 2002'den önce yayınlanmış 57 makaleyi incelemişlerdir. Bu inceleme sonucunda, güneş ışınlarına aralıklı-yoğun maruziyetin ve güneş yanıklarının melanoma riskini artırdığı, ancak, genellikle, kronik maruziyet ile melanoma gelişimi arasında ters bir orantı olduğu

ortaya konmuştur. Bununla birlikte, kronik olarak güneşe maruziyetin melanomadan korunmada bir yol olamayacağı, kronik maruziyeti olan bireylerde hiç güneş ışığına maruz kalmamış bireylere göre melanoma görülme riskinin daha yüksek olduğu özellikle belirtilmiştir.¹³⁶ Hem aralıklı-yoğun maruziyetin hem de kronik maruziyetin (özellikle güneşe karşı hassasiyeti fazla olan insanlarda) melanoma gelişiminde etkili olduğunu ifade eden çalışmalarda mevcuttur.^{134, 138} Melanomanın coğrafi dağılımı incelendiğinde, güneş ışınlarına en yoğun maruziyetin gerçekleştiği ekvatora yakın bölgelerde melanoma vakalarının fazlalığı da UV ışınları ile melanoma arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır.¹³⁹

Düzenli olarak güneşten koruyucu kullanımının melanoma üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, 1992 yılında aynı yerleşim bölgesinde yaşayan, 25-75 yaş aralığında olan 1621 kişi (güneşten koruyucu ürün kullanan 812 kişi, kullanmayan 809 kişi olacak şekilde) rastgele seçilerek 2006 yılının sonuna kadar melanoma gelişimi açısından takip edilmiştir. Çalışma sonucunda, melanomanın, düzenli olarak güneşten koruyucu ürün kullanımı ile yetişkinlerde önlenebileceği ifade edilmiştir.¹⁴⁰

Bronzlaşmayı sağlayan solaryum cihazlarının (%97 UVA; % 3 UVB yayarlar) melanoma riskini artırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiş ve 2009 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (“International Agency for Research on Cancer”, IARC) tarafından kanserojenler (grup 1) sınıfına dahil edilmiştir.^{139, 141}

UV ışınları, DNA hasarı meydana getirerek melanoma riskini artırmaktadır. DNA kromofor özellikte olup UV ışınlarını absorbe etmektedir. DNA'nın UVB ışınlarını (UVA ışınlarını zayıf bir şekilde absorplamaktadır) absorblaması sonucu bitişik iki pirimidin bazının (timin, sitozin) arasında siklobütan pirimidin dimerleri oluşmakta ve melanoma gelişimine neden olmaktadır.^{139, 142} UV ışınları, oksidatif stres oluşturarak da DNA'ya hasar vermektedir. Serbest oksijen radikalleri, guanin bazını 8-

hidroksideoksiguanozin (8-OHdG)'e dönüştürmekte, oluşan 8-OHdG'de protein-DNA çapraz bağlanması, tek zincir kırıkları ve timin-glikol oluşumu gibi mekanizmalarla DNA'da hasara yol açmaktadır. CDKN2A (siklin-bağımlı kinaz inhibitör 2A), p53, PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile BRAF ve NRAS onkogenlerinde görülen mutasyonlar melanoma gelişiminde etkilidir.^{139, 143} Hücre çoğalması, hücre canlılığı, farklılaşması süreçlerinin düzenlenmesinde rol alan mitojenle-etkinleşen protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı aktivitesinin BRAF, NRAS, GNAQ (“guanin nükleotid-bağlayıcı protein”) mutasyonları sonucu artması, c-KIT (tirozin kinaz reseptörü) gen düzensizlikleri melanoma gelişiminde rol oynamaktadır. NRAS ve BRAF mutasyonları genel olarak aralıklı güneş maruziyeti sonucu oluşmuş hasarlı deride görülürken c-KIT mutasyonu ise kronik güneş maruziyeti hasarında meydana gelmektedir.¹⁴⁴

CDKN2A'daki mutasyonlar, kalıtsal melanoma vakalarının önemli bir kısmından sorumludur. CDKN2A tarafından kodlanan ve hücre döngüsü düzenleyicisi olan P16/INK4 proteini, siklin-bağımlı kinazları (CDK4, CDK6) inhibe ederek hücrelerin G1 fazı boyunca ilerlemesini durdurur. Mutasyon durumunda ise siklin-bağımlı kinazlar inhibe edilemediği için aktif CDK4 diğer bir tümör baskılayıcı olan retinoblastoma (Rb)'yi fosforilasyona uğratar ve transkripsiyon faktörü E2F'nin açığa çıkmasına ve böylece hücrenin S fazına geçmesine neden olur. Artan ve kontrol edilemeyen hücre bölünmesi ile tümör gelişimi başlar. CDKN2A tarafından kodlanan P14/ARF proteini ise p53 (tümör baskılayıcı gen)'ün yıkımını hızlandıran HDM2 (human double minute 2)'yi inhibe ederek etkisini göstermektedir.^{141, 144}

Atipik benlerin varlığı ve ben sayısı da melanoma oluşumunda risk faktörleridir.^{128, 131, 144-146} Genel olarak 50'den fazla beni olan veya 5'den fazla atipik beni olan kişilerde melanoma gelişme riski daha fazladır. Büyük benlere sahip kişilerde

de risk artmaktadır.^{128, 131, 145} Gandini ve ark.¹⁴⁵ tarafından, ben sayısı fazla olan (101-120 ben) kişilerin melanoma geliştirme risklerinin, ben sayısı az olan (0-15 ben) kişilere kıyasla 7 kat artış gösterdiği saptanmıştır. Yine aynı çalışmada, 5 atipik beni olan kişilerde, atipik ben buldurmayanlara göre melanoma görülme olasılığının 6 kat arttığı bildirilmiştir.¹⁴⁵

Bireylerin fenotipik özellikleri, melanomaya olan yatkınlığı belirlemektedir. Özellikle kızıl saçlı, güneşe hassasiyeti olan, kolay bronzlaşamayan ve güneş yanığına meyilli beyaz tenli kişilerde melanoma görülme olasılığının daha yüksek olduğu raporlanmıştır.^{141,144,147,148}

Yüce ve ark.¹⁴⁹ tarafından yaşlılarla ilgili yapılan bir çalışmada, yaşlı hastalarda cilt kanseri (özellikle kutanöz melanoma) insidansının ve mortalitesinin genç hastalarla karşılaştırıldığında son yıllarda daha fazla arttığı belirtilmiştir. Ayrıca, ailesinde melanoma öyküsü olan bireylerde melanoma görülme olasılığının daha yüksek olduğu ifade edilmiştir.^{141,146,148} Melanoma hastalarının yaklaşık %8-10'unun aile öyküsünde melanoma olduğu bildirilmiştir.¹⁴⁸ Yine kişinin çocukluk döneminde kanser öyküsü olması da melanoma için bir risk faktörüdür.¹⁴⁶

Melanomada Kullanılan Evreleme Sistemleri

Doğru tanının konması ve melanomanın evrelendirilmesi hastaya uygun müdahalenin yapılabilmesi için önemlidir. Tümörün klinik yayılımının gösterilmesi evrelemede temel amaçtır ve melanoma için birçok evreleme sistemi mevcuttur. Bunlardan birisi, Dr. Wallace H. Clark tarafından tanımlanan ve invazyon derinliğini belirten Clark düzeyleridir (Tablo 2.5).^{127, 130, 150}

Tablo 2.5. Clark düzeylerine göre melanomanın evrelendirilmesi^{127, 130, 150}

Düzyey 1	Tümör hücreleri sadece epidermistedir. (in situ melanoma)
Düzyey 2	Tümör hücreleri epidermisten papiller dermise inmiş ancak burayı tam doldurmamıştır.
Düzyey 3	Tümör hücreleri papiller dermise yayılmış ve burayı doldurmuştur. Retiküler dermise inme yoktur.
Düzyey 4	Tümör hücreleri retiküler dermise yayılmıştır.
Düzyey 5	Tümör hücreleri subkütan dokuya yayılmıştır.

Mevcut bir diğer evrelendirme sistemi ise, epiderminin granüler tabakasından, tümör hücresinin ulaştığı en alt noktanın kalınlığının ölçülmesi ile bulunan Breslow kalınlıklarının değerlendirilmesi ile yapılmaktadır. Kalınlık, melanomanın seyrinde önemli bir parametredir. Kalınlığın artması ile hücrelerin kan ve lenf dolaşımına ulaşması kolaylaşmakta ve metastaz olasılığı yükselmektedir.^{127, 130, 134, 151} 1.0 mm kalınlığında tümörlü hastalar, 10 yıl içinde, % 20'lik bir ölüm oranı olasılığına sahipken, 4.0 mm üzerindeki tümörlü hastalarda bu oran % 50 civarındadır.¹⁵⁰

Breslow kalınlığı oküler mikrometre ile kolaylıkla ölçülmekte, objektif ve tekrarlanabilir bir sonuç vermektedir. Clark düzeyinin ölçülmesi zordur ve Breslow kalınlığı sistemine göre daha subjektiftir. Breslow kalınlığı, kanser seviyesinin tanımlanmasında daha net sonuç vermesine karşılık, ince tümörlerin değerlendirilmesinde Clark düzeyinin tanımlanması oldukça önemlidir.¹⁵²

Günümüzde kullanılan yaygın evrelendirme sistemi ise, “Amerikan Kanser Komite Birliği (The American Joint Committee on Cancer; AJCC)” tarafından oluşturulan TNM (tümör, lenf nodu, metastaz) sistemidir. T, tümörün Breslow kalınlığını, primer tümördeki mitoz oranını ve ülserasyonu; N, metastatik lenf nodu sayısı ve lenf nodundaki metastatik kitleyi; M ise uzak metastazın yeri ve serum laktat dehidrojenaz seviyesi ile tanımlanmıştır.^{144,153-155} Bu sisteme göre evreler Tablo 2.6’da özetlenmiştir.^{128, 155, 156}

Tablo 2.6. TNM sistemindeki evreler^{128,155,156}

Evre	Tanımı
Evre I	Breslow kalınlığı ≤ 1.00 mm olan primer tümör mevcuttur. Metastatik lenf nodu veya uzak metastaz yoktur. Ülserasyon varlığına göre (yoksa IA, varsa IB) olarak ikiye ayrılmaktadır.
Evre II	Breslow kalınlığı 1.01-2.00 mm olan tümör mevcuttur. Metastatik lenf nodu sayısı 1, uzak metastaz yoktur. Tümör kalınlığı ve ülserasyon varlığına göre IIA, IIB ve IIC olmak üzere üçe ayrılmaktadır.
Evre III	Breslow kalınlığı 2.01-4.00 mm olan tümör mevcuttur. Metastatik lenf nodu (2 veya 3), akciğer metastazı mevcuttur. Lenfatik yaygınlığa göre IIIA, IIIB, IIIC olmak üzere üçe ayrılmaktadır.
Evre IV	Breslow kalınlığı >4.00 mm olan tümör, metastatik lenf nodu (≥ 4) ve uzak metastaz mevcuttur.

Malign melanoma metastazlarını, esas olarak bölgesel lenf nodlarına, iskelet ve merkezi sinir sistemine yapmaktadır. Bununla birlikte, malign melanoma akciğere de metastaz yapabilmektedir. Bu metastazlar genellikle pulmoner arterlere ulaşan tümör embolileri ile olmaktadır.¹⁵⁷

Melanomanın Klinik Tipleri

Melanoma, klinik ve patolojik özelliklerine göre yüzeysel yayılan melanoma, nodüler melanoma, akral lentiginöz melanoma ve lentigo malign melanoma olmak üzere 4 ana klinik tipte sınıflandırılmaktadır.^{128, 130, 131, 144}

- Yüzeysel Yayılan Melanoma

Melanoma vakalarının yaklaşık %50-75'ini oluşturur. Genellikle, aralıklı ve yoğun olarak UV'ye maruz kalma sonucunda ortaya çıkar. Erkeklerde sırt kısmında daha yoğun olarak görülürken kadınlarda alt ekstremitelerde daha yaygındır. Mevcut ben üzerinden melanoma gelişme riski en fazla olan melanoma türüdür. Pembe, kahverengi ve siyah gibi renk değişkenlikleri gösteren asimetrik bir lezyon olarak başlar. Lezyon üzerinde kabarıklık ve nodül oluşmasıyla dikey gelişim gösterir. Lezyonlarda kaşıntı ve kanama görülebilir.^{128, 131, 144,158}

- ***Nodüler Melanoma***

Melanoma vakalarının yaklaşık %15-35'ini oluşturarak en sık görülen ikinci melanoma türüdür. En tehlikeli ve en kötü ilerleme sürecine sahip melanomadır tipidir. Radyal gelişim fazı yoktur, dikey büyüme gösterir. Simetrik yapıda, mavi, pembe, kahverengi veya siyah renk değişkenlikleri gösteren kabarık bir lezyon şeklinde aniden ortaya çıkar ve hızlıca gelişim gösterir. Yaygın olarak ülserasyon ve kanama görülmektedir. Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır. Vücutta en çok baş, boyun ve gövdede görülür. İnvazyon kalınlığı fazla olduğundan metastaz yapma riski yüksektir.^{128, 131, 144, 159}

- ***Lentigo Malign Melanoma***

Melanoma vakalarının % 5-10'unu meydana getirir. Seyri en iyi ve radyal gelişim fazı en uzun olan melanoma türüdür. Kronik güneş maruziyetinin neden olduğu bu tür özellikle burun ve yanaklarda olmak üzere yüz ve boyun bölgesinde görülmektedir. Kahve-ten tonlarında, mat, düz ve asimetrik lezyonlar şeklinde ortaya çıkar. Uzun bir radyal gelişim evresinden sonra (5-20 yıl arasında) kalınlaşarak rengi koyulaşır. Dikey büyüme gösteren lezyonların oranı ise yaklaşık %5-10'dur. Kadınlarda erkeklere göre daha sık oluşmaktadır.^{128, 144, 160}

- ***Akral Lentiginöz Melanoma***

Beyaz ırkta nadir görülen (bu ırkta görülen melanomaların %5-10'u) bu melanoma tipi siyah ve sarı ırklarda daha fazla (bu ırklarda görülen melanomaların yaklaşık %45-70'i) görülmektedir. Tırnak yatağı, tırnak çevresi ve mukozalarda (oral kavite, vajina ve serviks; mukozal melanomalar ayrı bir grup halinde de sınıflandırılabilir) görülmektedir. Ayaklarda görülme sıklığı ellere göre daha fazladır, genel olarak başparmaklarda ortaya çıkar. Tırnak yatağında kahverengi-siyah pigmentasyon ile başlar. Ayak tabanında da (özellikle topuklar) görülmektedir. Dikey

büyümeyle birlikte lezyonda kabarma ve nodüller meydana gelir. Ülserasyon ve kanama görülebilir. Güneş ışığının bir risk faktörü olmadığı kabul edilmektedir.^{128, 131, 144, 161}

Melanoma Tedavisi

Melanoma tedavisi, hastalığın evresine göre belirlenmektedir. İnvazyonun az olduğu ilk evrelerde cerrahi eksizyon uygulanmaktadır.¹³⁴ Evre IIB ve III'de cerrahi eksizyon ile adjuvan tedavi de önerilmektedir.¹²⁸ Adjuvan tedavi, cerrahiden sonra hastalığın tekrarlanmasını önlemek amacıyla yapılmaktadır. Bu tedavide, 1 yıl süreyle hastaya yüksek doz interferon (IFN- α -2b), ilk 4 hafta iv yolla günlük 20 MU/m² dozda haftada 5 gün, daha sonra ise sc yolla 10 MU/m² dozda haftada 3 gün uygulanmaktadır. IFN'nin kanda kalış süresini uzatmak amacıyla hazırlanmış ve FDA tarafından onaylanmış olan PEG (polietilen glikol)-IFN- α ise 3-5 yıl süreyle haftada 1 kez sc yolla uygulanmaktadır.¹⁴⁴ Melanoma, genellikle radyoterapiye dirençli olarak nitelendirilmektedir. Ancak, cerrahi operasyon sonrasında hastalığın tekrarlanmasını önlemek amacıyla adjuvan tedavi olarak uygulanmaktadır.¹³⁴ Lezyonların ekstremitelerde çok sayıda ve yaygın olduğu durumlarda (intransit metastazlar) cerrahi eksizyon mümkün olmayabilir.¹⁴⁴ Bu durumda ise izole ekstremitte perfüzyonu (ILP) uygulanmaktadır. Bu yöntemde kemoterapötik ajan doğrudan ekstremitteye uygulanır. Sistemik kemoterapi uygulanmasına göre daha az toksik etkiye sahiptir.¹²⁸ Hastada metastaz olduğunda ise cerrahi işlem, radyoterapi ve kemoterapi seçenekleri düşünülmektedir.¹²⁸ Kemoterapide antikanser ajanlar tek veya kombine halde kullanılmaktadır. Dakarbazin, FDA tarafından 1975 yılında metastatik melanoma tedavisi için onaylanan ilk antikanser ajandır. Dakarbazin kullanımında elde edilen yanıt oranları % 15-25'dir ve ortalama yanıt süresi 5-6 aydır. Sadece dakarbazin ile tedavi edilen hastaların uzun süreli takibi, hastaların ancak <% 2'sinin 6 yıl hayatta kalabildiğini göstermiştir.¹⁶² Dakarbazinin yapısal analogu olan temozolomid de

melanoma tedavisinde denenmiş ve etkili (hasta yanıt oranı %14 civarındadır) bulunmuştur.¹⁶² Platinler (karboplatin, sisplatin) ve nitrozüreler (karmustin, lomustin, semustin ve fotemustin) ise tedavide kullanılan diğer kemoterapötik ajanlardır.¹²⁸ Bu iki grup için elde edilen yanıt oranları ise sırasıyla %15-19 ve %13-25'dir.¹⁶² Kemoterapötik ajanların kombine halde kullanılmasıyla tedaviye yanıtın artırılması mümkün olabilmektedir. Dakarbazin ile diğer kemoterapötik ajanların (sisplatin, vinblastin gibi) birlikte kullanımının tedaviye yanıtı artırdığı, ancak sağ kalım açısından herhangi bir üstünlük sağlamadığı görülmüştür.¹⁶² Kinaz inhibitörleri olarak vemurafenib (BRAF inhibitörü) 2011 yılında, dabrafenib (BRAF inhibitörü) ve trametinib (MEK inhibitörü) ise 2013 yılında FDA'dan onay almıştır. Bu inhibitörlerin dakarbazin tedavisine kıyasla sağ kalım süresini artırdığı gösterilmiştir.¹⁴⁴ İmmunoterapötik ajanlar da melanoma tedavisinde kullanılmaktadır.¹⁴⁴ Sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4), aktif T lenfositlerin hücre yüzeyinde eksprese edilen immün-modülatör bir moleküldür. 2011 yılında FDA'dan onay almış olan ipilimumab, CTLA-4'ü inhibe eden, T hücreleri tarafından tümörün tanınmasını artıran ve immün sistemin baskılanmasını engelleyen monoklonal antikordur. İpilimumab ve dakarbazin kombinasyonunun kullanımı, sadece dakarbazin kullanımına göre sağ kalım süresini artırmıştır.^{128, 144} T hücre yüzeyindeki immün sistemi baskılayan diğer bir reseptör ise programlanmış hücre ölüm reseptörü 1 (PD-1; "programmed death-1 receptor")'dir. Nivolumab ve lambrolizumab ise PD1'i hedef alarak immün sistem baskılanmasını önleyerek etki gösteren monoklonal antikordur (anti-PD-1 antikordur).¹⁴⁴ İmmün sistemin uyarılması ve apoptozun indüklenmesi için T hücrelerinde üretilen sitokinler de kullanılabilir. Melanoma tedavisinde, yüksek doz interlökin-2 (IL-2) kullanımı 1998 yılında FDA tarafından onaylanmıştır.¹³⁴

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasal Maddeler	Firma
Daidzein	LC Laboratories, ABD
DMSO	Carlo Erba, İtalya
Etanol	Tekkim, Türkiye
Etil Oleat	Fluka, ABD
FBS (Fetal sığır serumu “Fetal bovine serum”)	Biochrom, Almanya
İzopropil Alkol	Merck, Almanya
Jelatin A	Sigma-Aldrich, Almanya
Jelatin B	Sigma-Aldrich, Almanya
Lipoid S100	Lipoid GmbH, Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich, Almanya
MTT (3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-il)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolyum Bromür)	AppliChem, Almanya
Natrasol	Hercule
Penisilin/Streptomisin (10000U/ 10000 µg.mL ⁻¹)	Biochrom, Almanya
Potasyum Dihidrojen Fosfat	Riedel de Haen, Almanya
Potasyum Klorür	Merck, Almanya
Protasan UP G213	Novamatrix, Norveç
RPMI 1640	Wisent, Kanada
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Klorür	Merck, Almanya
Sodyum Monohidrojen Fosfat	Merck, Almanya
Transcutol	Gattefosse, Fransa
Tween 80	Merck, Almanya

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Cihazlar	Firma
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Telesystem 15, Danimarka
DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)	DSC Q 100, TA Instruments, ABD
ELISA (Mikroplak) okuyucu	Versamax, ABD
Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FT-IR) Spektrometresi	Bruker VERTEKS 70v, Bruker, Almanya
Hassas Terazı	Mettler Toledo, ABD
Hava Akımlı Kültür Kabini	SafeFast Elite, İtalya
HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi)	Agilent 1200 Series, Almanya
İklim Kabini	Mikrotest MIT, Türkiye
İnkübatör	Sanyo, Japonya
Malvern Mastersizer	Malvern Mastersizer Hydro 2000, Malvern Ins. Ltd, İngiltere
Mikropipet	Eppendorf, Almanya
pH Metre	Hanna Instruments HI 3220, ABD
TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu)	FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin, Hollanda
Ultraturrax cihazı	T18, Ultraturrax, İKA, Hindistan
Ultrasonik Banyo	Branson, ABD
UV-Vis Spektrofotometresi	Shimadzu, Japonya
Viskozimetre	Brookfield DV2T RV, ABD
Yatay Çalkalayıcılı Su Banyosu	WNE14, Memmert, Almanya
Yüksek Basınçlı Homojenizatör	APV 2000, APV Homogenizer, Almanya
Zetasizer	Zetasizer Nanoseries-ZS, Malvern Ins. Ltd, İngiltere

3.2. Metot

3.2.1. DZ'nin Fizikokimyasal Özelliklerinin Tayini

DZ'nin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek üzere FTIR ve UV spektrumları alınmıştır.

3.2.1.1. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektrumu

DZ için KBr diski hazırlanarak FT-IR spektrumu 4000-400 cm^{-1} aralığında elde edilmiştir.

3.2.1.2. UV Spektrumu

DZ'nin metanol içerisindeki 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik çözeltisi kullanılarak 200-400 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu alınmıştır.

3.2.2. DZ'nin HPLC ile Miktar Tayini

Literatür taraması sonucunda hareketli faz olarak metanol ve ultra saf su karışımının kullanılmasına karar verilerek değişik oranları denenmiş ve en uygun hareketli faz bileşimi seçilmiştir. DZ'nin miktar tayini için kullanılacak kromatografik koşullar Tablo 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. DZ miktar tayini için kullanılan kromatografik koşullar

Cihaz	HPLC; Agilent Technologies 1200 Series
Yöntem	Ters Faz Kromatografi /İzokratik Elüsyon
Kolon	C ₁₈ , 250 x 4.6 mm; 5 μm (Supelco)
Mobil Faz	Metanol: % 0.1 asetik asit içeren ultra saf su (55:45 h/h)
Akış Hızı	1 mL/dk
Dedektör	UV
Dalga Boyu	249
Sıcaklık	25 °C
Enjeksiyon Hacmi	20 μL

3.2.2.1. DZ'ye Ait Kalibrasyon Doğrusu

DZ'ye ait kalibrasyon doğrusunu elde etmek için DZ'nin metanol içerisindeki 50 µg/mL'lik stok çözeltisinden hareketle 0.5-32 µg/mL konsantrasyon aralığında yedi farklı konsantrasyonda standart çözelti (her bir konsantrasyondan 8'er adet olacak şekilde) hazırlamak üzere gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Standart çözeltilerin analizi belirlenen kromatografik koşullarda (Tablo 3.1) HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen pik alanı değerleri grafiğe geçirilerek regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi elde edilmiştir.

3.2.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, miktar tayininde kullanılacak olan yöntemin güvenilir olduğunu ve analizi gerçekleştirilen madde için belirlenen koşullarda özgün, doğru ve tekrarlanabilir olduğunu gösterir.¹⁶³

Analitik yöntem validasyonunun değerlendirilmesinde kullanılan parametreler aşağıdaki şekilde (Şekil 3.1) ifade edilebilir.¹⁶³



Şekil 3.1. Analitik yöntem validasyon parametreleri

Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı, belirli bir aralıkta, miktar tayini yapılacak olan etkin maddenin konsantrasyonu ile analiz sonuçlarının doğru orantılı olmasıdır. Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen pik alanları kullanılarak kalibrasyon doğrusu oluşturulmuştur. Elde edilen doğrunun regresyon analizi yapılarak doğru denklemi ve tanımlayıcılık (belirleyicilik,

belirlilik) katsayısı hesaplanmıştır. Doğrusallığını göstermek üzere doğrusallıktan ayrılış önem kontrolü yapılmıştır.

Doğruluk

Doğruluk, kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere yakınlığını ifade eden önemli bir parametredir. Yöntem validasyonu için doğruluk parametresi, gün içi ve günler arası olarak çalışılmıştır. DZ'nin stok çözeltisinden (50 µg/mL) hareketle metanol ile seyreltme sonucu üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL) 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Günler arası doğruluk analizi için tüm bu işlemler birbirini izleyen 3 gün boyunca tekrarlanmıştır. Sonuçların gerçek değerlere yakınlıklarının değerlendirilmesi amacıyla analiz sonucu elde edilen ortalama konsantrasyonlar ve etkin maddenin gerçek konsantrasyonları kullanılarak % bağıl hata hesaplanmıştır.

Kesinlik

Kesinlik, bir analitik yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlık derecesini tanımlamaktadır. Bir analitik yöntemin kesinliği, varyasyon katsayısı (VK) hesaplanarak değerlendirilir. Kesinlik, belirli koşullar altında, analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin ve tekrar elde edilebilirliğinin bir ölçüsüdür.

Tekrar Elde Edilebilirlik

Gün içi ve günler arası (3 gün boyunca) tekrar elde edilebilirliği saptamak için gün içi ve günler arası olarak çalışılmıştır. DZ'nin stok çözeltisinden (50 µg/mL) hareketle metanol ile seyreltme sonucu üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL) 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Günler arası doğruluk analizi için tüm bu işlemler birbirini izleyen 3 gün boyunca tekrarlanmıştır. Daha sonra, VK değerleri

hesaplanmıştır. Bu değerin %2'den düşük olması analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin göstergesidir.^{164, 165}

Tekrar Edilebilirlik

DZ'nin stok çözeltisinden (50 µg/mL) hareketle metanol ile seyreltme sonucu üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltiler arka arkaya altı kez analiz edilmiştir. Daha sonra, VK değerleri hesaplanmıştır. Analitik yöntemin tekrar edilebilirliğinin gösterilebilmesi açısından bu değerin %2'den düşük olması gerekmektedir.^{164, 165}

Duyarlılık

Analitik yöntemin duyarlılığı için saptanabilirlik sınırı (Limit of Detection, LOD) ve tayin edilebilirlik sınırı (Limit of Quantification, LOQ) belirlenmiştir. LOD, analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en küçük konsantrasyonu ifade eder ve sinyal:gürültü oranı 3:1'dir. LOQ ise analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk içinde tayin edilebildiği en düşük konsantrasyonunu ifade eder ve sinyal:gürültü oranı 10:1'dir.

Özgünlük

Özgünlük, bir analitik yöntemin sadece amaçlanan maddeyi tayin edebilme yeteneğini gösterir. Özgünlüğün değerlendirilmesi için etkin madde dışındaki diğer formülasyon bileşenlerinin bulunduğu nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda analiz edilerek etkin madde ile aynı koşullarda pik verip vermedikleri incelenmiştir.

Stabilite

DZ'nin analiz süresi boyunca stabil olduğunun gösterilmesi amacıyla DZ'nin stok çözeltisinden (50 µg/mL) hareketle metanol ile seyreltme sonucu üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL) 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler

hazırlanmış ve hazırlandıktan sonra 0., 24. ve 48. saatlerde analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. Formülasyon Çalışmaları

Tezimiz kapsamında, nanoemülsiyon formülasyonları yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Yukarıda da ifade edildiği gibi bu yöntem, nanoemülsiyonların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılan ve hazırlanan kaba emülsiyonun homojenizatör içerisindeki dar bir aralıktan geçirilmesiyle ara yüzeyin parçalanması ve küçük damlacıkların oluşması esasına dayanır.^{22, 166}

3.2.3.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Formülasyon geliştirmede Nemitz ve ark.'nın¹⁶⁷ yaptığı çalışmadan faydalanılmıştır. DZ'nin farklı ortamlardaki çözünürlüğü incelenmiş, en fazla çözüldüğü ortam olan etil oleat yağ fazı olarak seçilmiştir. Ancak, bu ortamdaki çözünürlüğü formülasyona ilave edilecek DZ miktarı açısından yetersiz olduğundan daha önce yapılmış çalışmalardan faydalanılarak formülasyona yardımcı çözücü olarak DMSO eklenmiştir.¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ Emülgatör olarak Lipoid S100 (soya lesitini) ve Tween 80 seçilmiştir. Etkin madde oranı ise genistein ile yapılan çalışmalar^{119, 162, 171, 172} göz önünde bulundurularak % 0.1 olarak belirlenmiştir.

Ön formülasyon çalışmalarında HLB değeri 11'de sabit tutularak farklı yağ, sürfaktan ve DMSO oranlarına sahip formülasyonlar hazırlanmış, hızlandırılmış stabilite testi, damlacık boyutu ve damlacık boyutu dağılımları değerlendirilerek optimum formülasyon bileşenleri belirlenmiştir.

Tez çalışmamızda, aynı zamanda yüksek basınçlı homojenizatörden geçiş sayısı ve uygulanan basınç da değerlendirilerek yöntem optimize edilmiştir.

3.2.3.2. Nanoemülsiyon Formülasyonunun Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları ile nanoemülsiyon formülasyonu optimize edilmiş ve devam çalışmalarında kullanılacak olan formülasyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.2’de verilmiştir. Etkin madde içermeyen ve içeren nanoemülsiyonlar sırasıyla B-NE ve DZ-NE olarak kodlanmıştır.

Tablo 3.2. B-NE ve DZ-NE formülasyon bileşenleri ve oranları.

Formülasyon Bileşeni	B-NE	DZ-NE
Etil oleat	% 10	% 10
Lipoid S100	% 5	%5
DMSO	% 5	%5
Tween 80	%10	% 10
Daidzein (DZ)	-	100 mg
Ultra Saf Su	km...100 g	km...100 g

Formülasyonların hazırlanmasında, yağ fazını oluşturan Lipoid S100 ve etil oleat 80°C’lik su banyosunda homojen hale getirilmiş ve daha sonra manyetik karıştırıcıda (500 rpm) karıştırılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra, içinde daidzein çözüldürülmüş olan DMSO (B-NE formülasyonu için sadece DMSO), manyetik karıştırıcı üzerinde (1000 rpm) damla damla yağ fazına ilave edilmiş ve 10 dakika daha karıştırılmıştır. Hazırlanmış olan homojen görümlü yağ fazı, su fazına manyetik karıştırıcıda (1000 rpm’de) damla damla ilave edilmiş ve 10 dakika daha karıştırılarak kaba emülsiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan kaba emülsiyon, 1000 bar basınç ile yüksek basınçlı homojenizatörden 2 devir olacak şekilde geçirilerek nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır.

3.2.3.3. NE-Bazlı Jel Formülasyonlarının Hazırlanması

Nanoemülsiyonlar akışkan sistemler olduğundan bunların viskozitelerini artırarak deri üzerine uygulanabilirliklerini kolaylaştırmak üzere formülasyona farklı

polimerler ilave edilebilmektedir.¹⁷³⁻¹⁷⁶

Tez kapsamında, ön formülasyon çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda Natrosol ve HPMC jel elde etmek amacıyla kullanılmış ancak her iki polimer kullanımında da bekletme ile (24 saat) çökme meydana geldiğinden, Protasan™ UP G 213 (suda çözünebilen kitosan glutamat) jel elde etmek amacıyla kullanılmıştır. %0.05 ve %1 (a/a) oranında Protasan™ UP G 213 nanoemülsiyona ilave edilerek 1 saat boyunca manyetik karıştırıcıda (300 rpm) karıştırılmış ve homojen görümlü bir jel elde edilmiştir. 1 hafta sonra yapılan makroskobik incelemelerde, % 0.05 Protasan™ UP G 213 kullanılan jellerde hafif bir kremalaşma meydana gelirken Protasan™ UP G 213'ün %1 oranında kullanıldığı jellerde bu sorunla karşılaşılması. Devam çalışmaları için nanoemülsiyon jel hazırlamak üzere polimerin %1 oranında kullanılmasına karar verilmiştir.

NE-bazlı jel formülasyonlarının hazırlanması için, %1 (a/a) oranında Protasan™ UP G 213, 20 g nanoemülsiyon formülasyonuna eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda (300 rpm) 1 saat karıştırılarak jelleşme sağlanmıştır. Etkin madde içermeyen ve içeren NE-bazlı jeller sırasıyla B-NEJ ve DZ-NEJ olarak kodlanmıştır.

3.2.3.4. Klasik Emülsiyon Formülasyonlarının Hazırlanması

Damlacık boyutunun hazırlanan formülasyonlarda karakterizasyonu nasıl değiştireceğini gözlemlemek üzere nanoemülsiyon formülasyonu ile aynı bileşenleri ve bileşen oranlarını içeren klasik emülsiyon formülasyonları Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra, "Ultraturax" cihazı (T18, Ultraturax, IKA, Hindistan) kullanılarak 10000 rpm'de 5 dk. homojenize edilmiştir (ancak, yüksek basınçlı homojenizatörden geçirme işlemi uygulanmamıştır). Etkin madde içermeyen ve içeren klasik emülsiyon formülasyonları sırasıyla B-KE ve DZ-KE olarak kodlanmıştır.

Hazırlanan nanoemülsiyon ve klasik emülsiyon formülasyonları için iletkenlik testi ile tip tayini gerçekleştirilmiştir. İletkenlik ölçümü Mettler Toledo Seven2Go (Güney Kore) cihazı kullanılarak yapılmış ve her bir ölçüm 6 kez tekrarlanmıştır.

3.2.4. Hazırlanan Formülasyonların Karakterizasyonu

Hazırlanan formülasyonlarda faz ayrımı olup olmadığı makroskobik olarak incelenmiş ve daha sonra santrifüj testi, pH tayini, zeta potansiyel ve damlacık boyutu ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.1. Santrifüj Testi

Hazırlanan formülasyonların hızlandırılmış stabiliteelerinin incelenmesi amacıyla santrifüj testi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, falkon tüplere 5 g formülasyon tartılmış ve oda sıcaklığında 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda faz ayrımı olup olmadığı makroskobik olarak değerlendirilmiştir.¹⁷⁷

3.2.4.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı ve Zeta potansiyel Ölçümü

Hazırlanan nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonlarının damlacık büyüklüklerinin ve dağılımlarının belirlenmesinde dinamik ışık saçılımı yöntemi esasına göre ölçüm yapan Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Ins. Ltd. İngiltere) kullanılmıştır. Zeta potansiyel ölçümü de aynı cihaz ve tek kullanımlık zeta hücreleri kullanılarak belirlenmiştir. Gerek damlacık büyüklüğü gerekse zeta potansiyel ölçümleri 6 farklı örnek (1:80 oranında seyreltilmiş) üzerinden 25°C'de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir.

Klasik emülsiyonların damlacık büyüklüklerinin ölçülmesinde ise Lazer Kırınımı Yöntemi kullanılmıştır. Ölçümler, Malvern Mastersizer cihazı (Malvern Ins. Ltd. İngiltere) ile 6 farklı örnek hazırlanarak 25°C'de gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir.

3.2.4.3. pH Tayini

Hazırlanan formülasyonların pH değeri, pH metre kullanılarak 3'er kez ölçülmüş ve sonuçlar ortalama değer olarak verilmiştir.

3.2.4.4. Reolojik Analiz

Hazırlanan formülasyonların viskozitelerinin ölçülmesi için Brookfield DV2T koni-plak viskozimetresi (Brookfield Engineering Laboratories, ABD) kullanılmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında ve 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sırasında, 0.5 mL formülasyon ile çalışılmış ve CP40 plağı kullanılmıştır.

3.2.4.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

DZ'nin, formülasyona giren diğer bileşenlerin ve formülasyonların içindeki DZ'nin termal özelliklerini gözlemlemek üzere DSC analizi yapılmıştır. Analizler, Hacettepe Üniversitesi HÜNİKAL'de bulunan DSC Q100 (TA Ins., ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Katı örnekler için alüminyum pan, sıvı örnekler için ise alüminyum hermetik panlar kullanılmıştır. Örnekler 5 mg olacak şekilde uygun pan içinde tartıldıktan sonra, kapakları sıkıştırılarak kapatılmıştır. DSC analizi, 25-400 °C sıcaklık aralığında ve 10 °C/dk ısıtma hızı ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.6. FT-IR Analizi

Formülasyon bileşenlerinin ve formülasyonların FT-IR spektrumları Atatürk Üniversitesi-DAYTAM'da bulunan Bruker VERTEKS 70v cihazı (Bruker, Almanya) kullanılarak alınmıştır. Ölçümler vakum altında gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.7. Morfolojik Analizler

Nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jeller TEM (FEI Tecnai G2 Spirit BioTwin, Hollanda) kullanılarak görüntülenmiştir. Formülasyonlar 100 kat seyreltikten sonra, 400 mesh karbon film kaplı bakır ızgara üzerine damlatılmış ve 24

saat boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Izgaralar daha sonra, 80 kV'de görüntülenmiştir.

3.2.5. İn Vitro Salım Çalışmaları

DZ içeren nanoemülsiyon, klasik emülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jelden etkin madde salımı incelenmiş ve salım sonuçları karşılaştırılmıştır. Klasik emülsiyon ile nanoemülsiyon formülasyonu arasında karşılaştırma yapılarak damlacık boyutunun; nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jel arasındaki fark incelenerek de viskozitenin etkin madde salımı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Formülasyonlar için *in vitro* salım çalışmaları gerçekleştirilmeden önce, DZ'nin salım ortamındaki çözünürlüğünün ve stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.2.5.1. DZ'nin İn Vitro Salım Ortamlarındaki Çözünürlük Tayini

DZ ile yapılan çalışmalar incelendiğinde salım ortamı olarak farklı ortamların kullanıldığı görülmüştür. Salım çalışmalarında, genellikle pH 7.4 fosfat tamponu (PB) veya PBS ya da bunlarla birlikte DZ'nin çözünürlüğünü artırmaya yönelik bir yardımcı çözücünün veya yüzey aktif maddenin kullanıldığı da tespit edilmiştir.^{83, 94, 96, 113, 116, 171}

Genistein veya onun analogu olan DZ'yi içeren formülasyonların *in vitro* salım çalışmalarında, %30 etanol veya %50 metanol içeren PB/PBS pH 7.4 veya SDS (%3) içeren sulu çözeltiler kullanılarak sink koşul sağlanmıştır.^{83, 96, 171, 178}

Tez çalışmamızda, *in vitro* salım için sink koşulun sağlanması amacıyla %5 SDS içeren PBS pH 7.4 ortamı kullanılmıştır. Seçilen salım ortamında DZ çözünürlüğünün belirlenmesi amacıyla DZ'nin aşırı miktarı flakonlara tartılarak alınmış ve üzerine %5 SDS içeren PBS pH 7.4 ilave edilmiştir. Flakonun ağzı kauçuk kapak ve alüminyum kapakla sıkıca kapatılmış ve DZ'nin ışıktan korunması amacıyla flakonlar alüminyum folyoyla kaplanmıştır. Flakonlar, yatay çalkalayıcı su banyosuna yerleştirilmiş ve belirli süreler boyunca (1., 3., 5., 8., 10., 12. saat) 37°C'de çalkalanmıştır. Belirlenen süreler

sonrasında örnekler alınarak 5000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve daha sonra 0.45 µm'lik filtreden süzölmüştür. Süzöntüdeki çözünmüş DZ miktarı valide edilmiş HPLC yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Her zaman noktası için 3 farklı örnekle çalışılmıştır.

3.2.5.2. İn Vitro Salım Koşullarında DZ Stabilitesinin İncelenmesi

İn vitro salım süresince DZ'nin stabil olup olmadığının incelenmesi amacıyla, %5 SDS içeren PBS pH 7.4'de DZ'nin 32 µg/mL'lik çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, Franz difüzyon hücresinin reseptör bölmesine konulmuştur. Difüzyon hücreleri, 37°C'lik su banyosu içindeki pleksiglas yuvalara yerleştirilmiştir ve etkin maddenin ışıktan korunması amacıyla salım düzeneğinin gerekli kısımları alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Belirlenen zaman noktalarında (0., 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10. ve 12. saat) örnek alınarak DZ miktarı valide edilmiş HPLC yöntemi kullanılarak tayin edilmiştir. Çalışma 6 farklı örnek üzerinden yapılmış ve sonuçlar ortalama olarak verilmiştir.

3.2.5.3. İn vitro Salım Çalışması

İn vitro salım çalışmaları, dikey Franz difüzyon hücreleri (inert camdan yapılmış) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Franz difüzyon hücreleri donör ve reseptör bölme (hacmi 10 mL) olmak üzere iki parçadan oluşmuştur ve donör bölme ile reseptör bölme arasındaki difüzyon alanı 2.5 cm²'dir. Çalışma sırasında, difüzyon hücreleri reseptör bölmenin tamamı su banyosunun içinde kalacak şekilde pleksiglas yuvalara yerleştirilmiş ve etkin maddenin ışıktan korunması amacıyla salım düzeneğinin gerekli kısımları alüminyum folyo ile kaplanmıştır.

Hazırlanan formülasyonların akışkan olması sebebiyle donör ve reseptör bölme arasından sızıntı olmasını önleyebilmek için, selofan membran (MWCO 12400 Da; Sigma-Aldrich, Almanya) yerleştirilmesinden sonra, iki bölmenin birleştiği kısım dıştan

parafilm ile sarılmış ve bölmeler metal yaylarla sabitlenmiştir. Selofan zarın kurumaması için donör bölmeye birkaç damla ultrasaf su ilave edilerek gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün, donör bölmedeki su boşaltılarak, reseptör bölmeye önceden süzölmüş ve içinde hava kalmaması için degaze edilmiş salım ortamı konulmuştur. Difüzyon hücreleri, 37 °C’de su banyosu içerisindeki pleksiglas yuvalara yerleştirilmiş ve 600 rpm’de (manyetik karıştırma) dengeye gelene kadar tutulmuştur. Daha sonra, donör bölmeye 0.75 mL formülasyon konularak salım çalışması başlatılmıştır. Belirlenen zaman aralıklarında (0.5, 1., 2., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12. saat) 0.5 mL örnek reseptör bölmenin kolundan “Chiba” iğnesi ve insülin enjektörü ile alınarak yerine aynı hacim ve sıcaklığa sahip taze salım ortamı eklenmiştir. Alınan örnekler, HPLC ile analiz edilerek DZ miktarı saptanmıştır.

3.2.6. Hazırlanan Formülasyonlara Ait Stabilite Çalışmaları

Etkin madde içeren ve içermeyen nanoemülsiyon, nanoemülsiyon bazlı jel ve klasik emülsiyonların stabilite çalışmaları 4 °C ve 25 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta, 90 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Formülasyonların stabilitesi, damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı, zeta potansiyel, pH, viskozite ve etkin maddenin stabilitesi saptanarak değerlendirilmiştir.

3.2.6.1. Makroskobik inceleme

Hazırlanan formülasyonların fiziksel görünümünde değişiklik olup olmadığı, formülasyonlarda faz ayrımı meydana gelip gelmediği makroskobik olarak incelenmiştir.

3.2.6.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü

Nanoemülsiyon, nanoemülsiyon bazlı jel ve klasik emülsiyon için Bölüm 3.2.4.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.3. pH Tayini

Formülasyonların pH tayini Bölüm 3.2.4.3'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.4. Reolojik Analiz

Formülasyonların reolojik analizi Bölüm 3.2.4.4'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.5. Etkin Madde Stabilitesi

Stabilite çalışması süresince, formülasyonlarda stabil kalan etkin madde miktarının saptanması amacıyla 0.25 g formülasyon balon jöjeye alınarak metanol ile hacmi 10 mL'ye tamamlanmış ve manyetik karıştırıcıda (500 rpm) 15 dk karıştırılmıştır. Çalışma sırasında, DZ'yi ışıktan korumak amacıyla balon jöjelerin etrafı alüminyum folyo ile iyice kaplanmıştır. Örnekler, 0.45 µm'lik membran filtrelerden süzülerek HPLC ile analiz edilmiştir.

3.2.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.7.1. Melanoma Hücre Hattında Sitotoksosite Çalışması

SK-MEL 30/ An1 insan melanoma hücre dizisi (Şap Enstitüsü, HÜKÜK Kayıt No: 03010901) kullanılarak sitotoksosite çalışması gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı olarak, %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin) içeren RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücreler 25 cm² alana sahip flasklar içinde 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücrelerin plaklara ekimi aşamasında tripsinizasyon (1 mL, tripsin-EDTA (%0.25) çözeltisi kullanılarak) işlemi gerçekleştirilmiş, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra, hücre süspansiyonu içeren tüplere serum içeren hücre kültür ortamı eklenerek tripsinin inaktive olması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve kültür ortamı eklenerek hücreler yeniden süspande edilmiş ve hücre sayımı yapılmıştır. Çalışmada, 96 kuyucuklu plaklar

kullanılmış ve 5×10^4 hücre/kuyu gelecek şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücre ekimini takiben, hücreler, kültür ortamı içerisinde 24 saat inkübasyona ($37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda kültür ortamı uzaklaştırılmış ve Tablo 3.3’de bilgileri verilen DZ çözeltisi ve formülasyonlar (UV ışını altında sterilize edilmişlerdir), her bir kuyucuğa $100\ \mu\text{L}$ olarak ilave edilmiştir. Kültür plakları, 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı sürede inkübasyona ($37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, mevcut kültür ortamı uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa $100\ \mu\text{L}$ taze kültür ortamı ve $13\ \mu\text{L}$ MTT eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara $100\ \mu\text{L}$ izopropil alkol eklenerek, plaklar çalkalanmış ve ardından $570\ \text{nm}$ ’de absorbansları tayin edilmiştir. Formülasyon ilave edilmeden kültür ortamında inkübasyona bırakılan hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu değerlerine göre her grup için % hücre canlılığı hesaplanmıştır (Şekil 3.2).

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{\text{Uygulama yapılmış kuyu için optik dansite (OD) değeri}}{\text{Uygulama yapılmamış kuyu (Kontrol) için OD Değeri}} \times 100$$

Şekil 3.2. % Hücre canlılığının hesaplanması amacıyla kullanılan eşitlik

Tablo 3.3. Hücre kültürü çalışmasında kullanılan gruplar ile ilgili bilgiler

Formülasyon Kodu	Açıklama
K1	Kontrol (sadece hücre kültür ortamı uygulanmış)
K2	%2 DMSO içeren hücre kültür ortamı
90 μM Saf DZ	%2 DMSO içeren hücre kültür ortamındaki $90\ \mu\text{M}$ ’lık DZ çözeltisi
90 μM DZ-NE	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek $90\ \mu\text{M}$ derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan NE
90 μM DZ-NEJ	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek $90\ \mu\text{M}$ derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan NEJ
90 μM DZ-KE	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek $90\ \mu\text{M}$ derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan KE

Tablo 3.3. (Devamı)

B-NE-90 μM	90 μ M DZ derişime sahip DZ-NE formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> NE
B-NEJ-90 μM	90 μ M DZ derişime sahip DZ-NEJ formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> NEJ
B-KE-90 μM	90 μ M DZ derişime sahip DZ-KE formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> KE
180 μM Saf DZ	%2 DMSO içeren hücre kültür ortamındaki 180 μ M'lık DZ çözeltisi
180 μM DZ-NE	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek 180 μ M derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan NE
180 μM DZ-NEJ	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek 180 μ M derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan NEJ
180 μM DZ-KE	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek 180 μ M derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan KE
B-NE-180 μM	180 μ M DZ derişime sahip DZ-NE formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> NE
B-NEJ-180 μM	180 μ M DZ derişime sahip DZ-NEJ formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> NEJ
B-KE-180 μM	180 μ M DZ derişime sahip DZ-KE formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> KE
270 μM Saf DZ	%2 DMSO içeren hücre kültür ortamındaki 270 μ M'lık DZ çözeltisi
270 μM DZ-NE	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek 270 μ M derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan NE
270 μM DZ-NEJ	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek 270 μ M derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan NEJ
270 μM DZ-KE	Hücre kültür ortamı ile seyreltilerek 270 μ M derişimde DZ içerecek şekilde hazırlanan KE
B-NE-270 μM	270 μ M DZ derişime sahip DZ-NE formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> NE
B-NEJ-270 μM	270 μ M DZ derişime sahip DZ-NEJ formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> NEJ
B-KE-270 μM	270 μ M DZ derişime sahip DZ-KE formülasyonu ile aynı seyreltmeye sahip <u>boş</u> KE

3.2.7.2. Fibroblast Hücre Hattında Sitotoksosite Çalışması

PCS-201-012 normal, primer insan dermal fibroblast hücre dizisi (Primary Dermal Fibroblasts, Normal, Human, Adult, ATCC, ABD) kullanılarak sitotoksosite çalışması gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamı olarak, %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin-streptomisin-amfoterisin B) içeren RPMI 1640 kullanılmıştır. Hücreler 25 cm² alana sahip flasklar içinde 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücrelerin plaklara ekimi aşamasında tripsinizasyon (1 mL, tripsin-EDTA (%0.25) çözeltisi kullanılarak) işlemi gerçekleştirilmiş, hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlanmıştır. Daha sonra, hücre süspansiyonu içeren tüplere serum içeren hücre kültür ortamı eklenerek tripsinin inaktive olması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonu santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve kültür ortamı eklenerek hücreler yeniden süspande edilmiş ve hücre sayımı yapılmıştır. Çalışmada, 96 kuyucuklu plaklar kullanılmış ve 5x10⁴ hücre/kuyu gelecek şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücre ekimini takiben, hücreler, kültür ortamı içerisinde 24 saat inkübasyona (37 °C, %5 CO₂) bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda kültür ortamı uzaklaştırılmış ve Tablo 3.3'de bilgileri verilen DZ çözeltisi ve formülasyonlar (UV ışını altında sterilize edilmişlerdir), her bir kuyucuğa 100 µL olarak ilave edilmiştir. Kültür plakları, 24 ve 48 saat olmak üzere iki farklı sürede inkübasyona (37 °C, %5 CO₂) bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, mevcut kültür ortamı uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 90 µL taze kültür ortamı ve 10 µL MTT eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklara 100 µL DMSO eklenerek, plaklar çalkalanmış ve ardından 570 nm'de absorbanları tayin edilmiştir. Formülasyon ilave edilmeden kültür ortamında inkübasyona bırakılan hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu değerlerine göre her grup için % hücre canlılığı hesaplanmıştır (Şekil 3.2).

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, ortalama±standart sapma (SS) şeklinde verilmiştir. Tüm istatistiksel analizler “SPSS Statistics Version 22.0 (SPSS Inc., Chicago, ABD)” programı kullanılarak yapılmıştır. Bağımsız grupların ikili eşleştirmelerinde Mann Whitney U testi, İki bağımlı grubun karşılaştırıldığı durumlarda Wilcoxon testinden yararlanılmıştır. Deney sonuçları arasında farklılığın anlamlı olup olmadığı saptanmış ve $p<0.05$ ise farklılık anlamlı kabul edilmiştir.

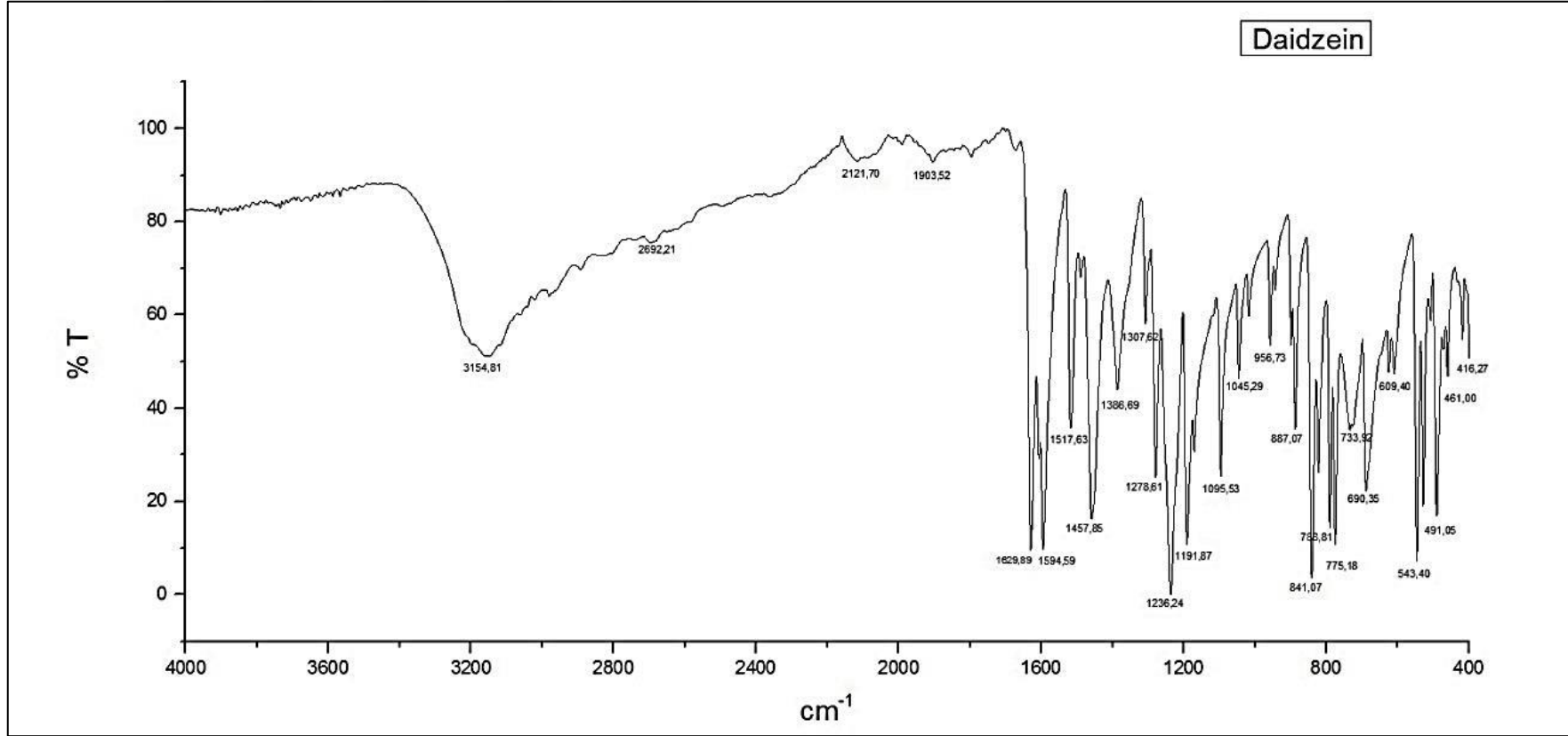


4. BULGULAR

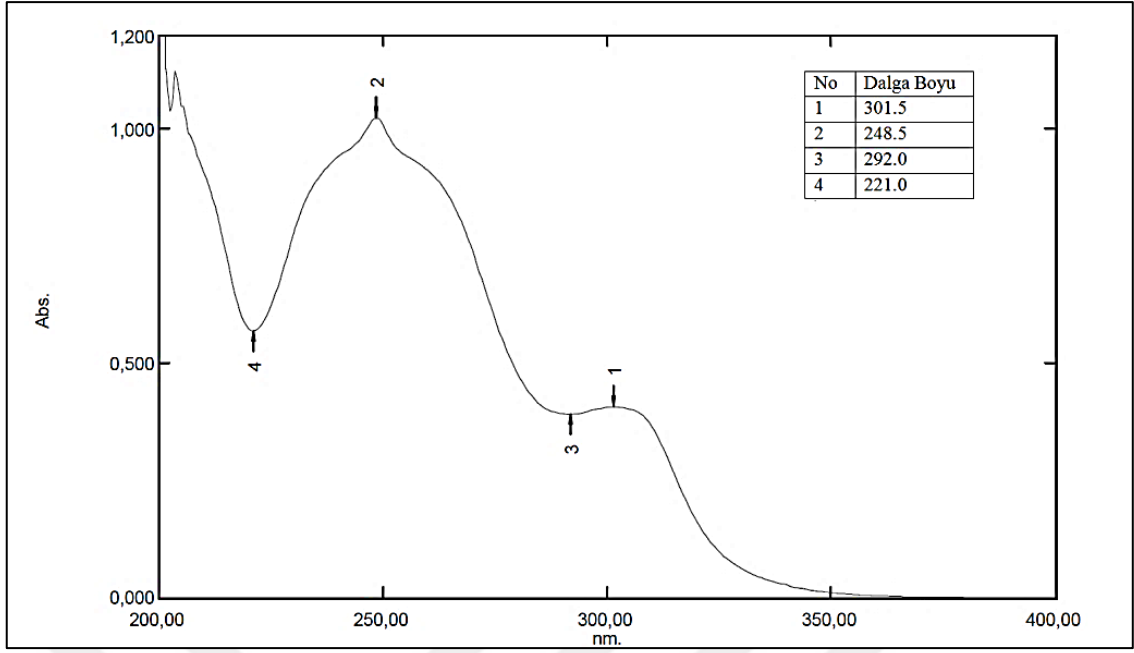
4.1. DZ'nin Fizikokimyasal Özellikleri

DZ'nin fizikokimyasal özelliklerinin tayin edilmesi amacıyla Bölüm 3.2.1.1'de anlatıldığı şekilde FT-IR spektrumu (Şekil 4.1) alınmıştır. Çeşitli yapılarıdaki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinilebilmesi açısından FT-IR analizi gerçekleştirilerek yapıda var olan çeşitli bağların titreşim frekansları ölçülmüştür.¹⁷⁹ DZ'nin FT-IR spektrumu (Şekil 4.1) incelendiğinde; 3154.81 cm⁻¹'de -OH (intermoleküler) gerilme titreşimi, 1191.87 cm⁻¹'de -OH deformasyonu, 841.07 cm⁻¹ ve 788.81 cm⁻¹'de C-H (aromatik yapıda) eğilme titreşimleri, 1629.89 cm⁻¹'de -C=O grubuna ait gerilme titreşimi, 1236.24 cm⁻¹ ve 1278.61 cm⁻¹'de C-O gerilme titreşimleri, 1594.59-1457.85 cm⁻¹ aralığında C=C (aromatik yapıda) gerilme titreşimleri, 609.40 cm⁻¹'de C=O düzlem içi eğilme titreşimi tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, farklı gruplar tarafından yapılan çalışma sonuçlarıyla uyum göstermektedir.¹⁸⁰⁻¹⁸⁴

Bölüm 3.2.1.2'de anlatıldığı şekilde DZ'nin UV spektrumu da (Şekil 4.2) alınmış ve DZ'nin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu (λ_{\max}) 248.5 nm olarak saptanmıştır (Şekil 4.2). İzoflavonoidlerin farklı UV absorpsiyon spektrumları söz konusudur. İzoflavonların spektrumu, 245-275 nm aralığında ve 300-330 nm aralığında (bu aralıkta bağıl yoğunluğu düşüktür) olmak üzere iki maksimum absorpsiyona sahiptir. Metanol içerisinde DZ için elde edilen λ_{\max} değerinin 249 nm olduğu bildirilmiştir.¹⁸⁵ Benzer veriler farklı çalışmalarda da raporlanmıştır.^{180, 186, 187}



Şekil 4.1. DZ'ye ait FT-IR spektrumu

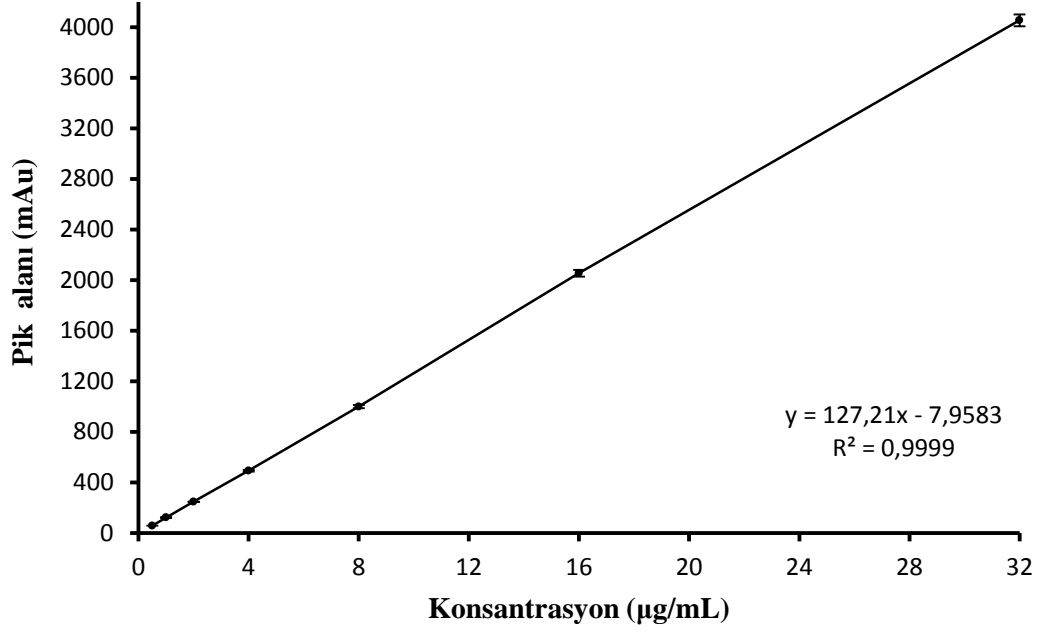


Şekil 4.2. DZ'ye ait UV spektrumu

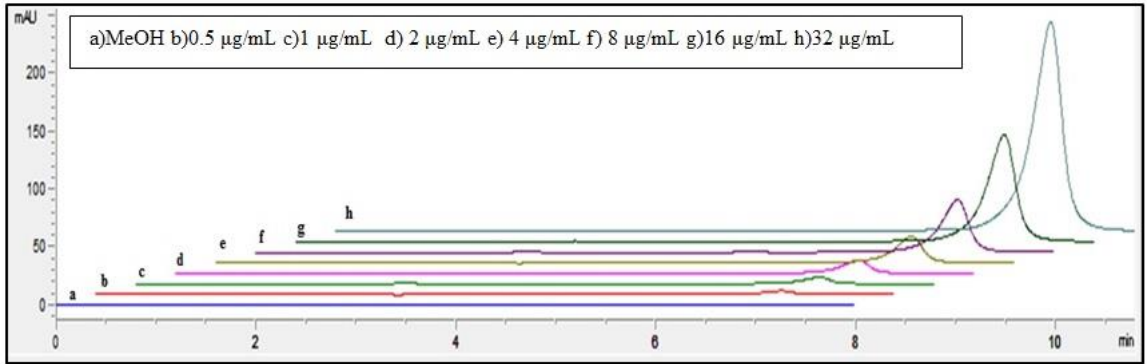
4.2. DZ'nin HPLC ile Miktar Tayini

4.2.1. Kalibrasyon Doğrusu

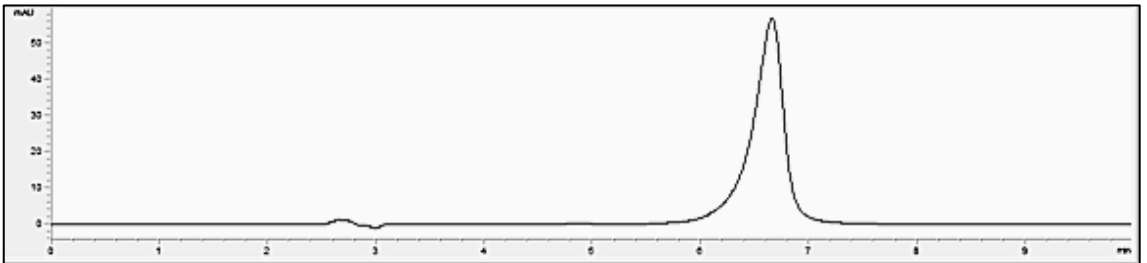
DZ'nin kalibrasyon doğrusunu elde etmek üzere Bölüm 3.2.2.1'de anlatıldığı şekilde çalışılarak 8 farklı seri üzerinden elde edilen kalibrasyon doğruları ve denklemleri kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda bulunan ortalama değerler üzerinden oluşturulan kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.3'de gösterilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen DZ'ye ait HPLC kromatogramları ise Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.3. DZ'ye ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi (n=8)



Şekil 4.4. Artan konsantrasyonlardaki DZ standart çözeltileri için elde edilen HPLC kromatogramları



Şekil 4.5. DZ'in 10 µg/mL derişimdeki çözeltilisine ait kromatogram

4.2.2. Analitik Yöntem Validasyonu

DZ'nin miktar tayininde kullanılacak analitik yöntemin validasyonu doğrusallık, doğruluk, kesinlik, özgünlük ve analiz süresince stabilite parametrelerini sağlamak üzere Bölüm 3.2.2.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1. Doğrusallık

DZ'nin metanol içerisindeki 50 µg/mL'lik stok çözeltisinden hareketle 0.5-32 µg/mL konsantrasyon aralığında yedi farklı konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlanmıştır (her bir konsantrasyondan 8'er adet olacak şekilde). Analiz sonucunda, konsantrasyon değerleri ilgili pik alanlarına karşı grafiğe geçirilmiş, kalibrasyon doğruları ve doğrusal regresyonla doğru denklemleri elde edilmiştir. Tanımlayıcılık katsayısının 0.9999 olduğu görülmüştür. Ayrıca, her serinin kalibrasyon doğrusuna ait eğimler karşılaştırılmış ve VK değeri <%1 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak, analitik yöntemin söz konusu konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3).

4.2.2.2. Doğruluk

Yöntem validasyonunda doğruluk parametresi gün içi ve günler arası olarak incelenmiştir. 0.5, 4 ve 32 µg/mL derişimlerinde (her birinden 6'şar adet olacak şekilde) hazırlanan standart DZ çözeltilerinin analizi sonucu pik alanları bulunmuş ve kalibrasyon doğrusunda yerine konarak ortalama, standart sapma, VK, % bağıl hata ve % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçların gerçek değerlerine yakınlık derecesinin değerlendirilmesinde %bağıl hata ve % geri kazanım değerleri kullanılmıştır. Her konsantrasyon için, % bağıl hatanın %2'den küçük olması ve %geri kazanım değerinin %98-102 arasında olması önerilmektedir.¹⁸⁸ Gün içi ve günler arası doğruluk sonuçları Tablo 4.1'de verilmiş ve analitik yöntemin doğruluk parametresini sağladığı tespit edilmiştir.

4.2.2.3. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinlik parametresinin değerlendirilmesinde tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik saptanmıştır. Tekrar elde edilebilirliğin saptanması için üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL) 6'şar adet olacak şekilde DZ'nin standart çözeltileri hazırlanmış ve aynı gün içinde arka arkaya ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Günler arası için tüm bu işlemler birbirini izleyen 3 gün boyunca tekrarlanmıştır. VK değerleri hesaplanmıştır. Tekrar edilebilirlik içinse üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL) standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı çözeltiler arka arkaya altı kez analiz edilmiş ve sonrasında VK değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de verilmiştir. VK'nın %2'den küçük olması analitik yöntemin kesinlik parametresini sağladığını göstermiştir.

Tablo 4.1. Miktar tayini yöntemi için saptanan gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik (tekrar elde edilebilirlik) değerleri

	Hazırlanmış Çözelti Konsantrasyonları (µg/mL)	Tayin Edilen Ortalama Konsantrasyon (µg/mL; X±SS; n=6)	% Bağıl Hata	% Geri Kazanım	VK (%)
Gün içi	0.5	0.509±0.008	1.813	101.813	1.517
	4	4.040±0.030	1.003	101.003	0.741
	32	32.056±0.097	0.175	100.175	0.302
Günler arası	0.5	0.503±0.006	0.700	100.700	1.219
	4	4.019±0.022	0.477	100.477	0.549
	32	32.083±0.046	0.261	100.261	0.142

X: Ortalama; SS: Standart sapma; VK: Varyasyon katsayısı

Tablo 4.2. Miktar tayini yöntemi için saptanan tekrar edilebilirlik sonuçları

Hazırlanmış Çözelti Konsantrasyonları (µg/mL)	Tayin Edilen Ortalama Konsantrasyon (µg/mL; X±SS; n=6)	VK (%)
0.5	0.502±0.003	0.601
4	4.006±0.008	0.207
32	32.209±0.023	0.072

X: Ortalama; SS: Standart sapma; VK: Varyasyon katsayısı

4.2.2.4. Duyarlılık

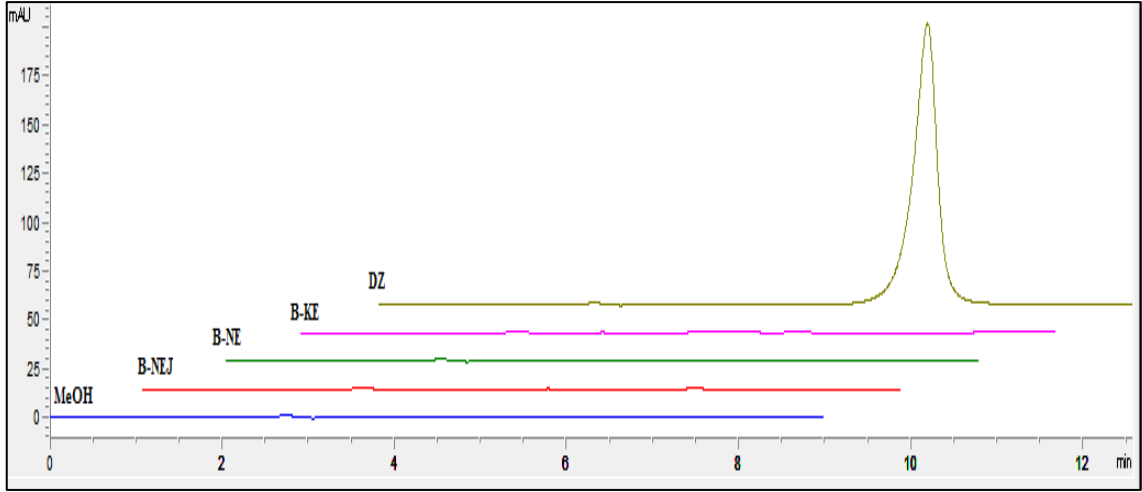
Analitik yöntemin duyarlılığının incelenmesi amacıyla, LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen analitik yöntem için LOD değeri 3 ng/mL, LOQ değeri ise 10 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

4.2.2.5. Özgünlük

Özgünlüğün değerlendirilmesi için etkin madde dışındaki diğer tüm formülasyon bileşenlerini içeren B-NE, B-KE ve B-NEJ formülasyonları hazırlanmış ve etkin madde analizinin yapıldığı koşullarda analiz edilerek etkin madde ile aynı koşullarda pik verip vermedikleri incelenmiştir. Şekil 4.6'da verilen kromatogramlar incelendiğinde geliştirilen analitik yöntemin DZ'ye özgü olduğu görülmektedir.

4.2.2.6. Stabilite

DZ'nin analiz süresi boyunca stabil olduğunun gösterilmesi amacıyla üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL) 6'şar adet olacak şekilde DZ'nin standart çözeltileri hazırlanmıştır. Örnekler hazırlandıktan hemen sonra, hazırlandıktan 24 saat sonra ve 48 saat sonra HPLC ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te verilmiştir. Kabul edilebilir stabilite, yeni hazırlanmış standartlara göre standart veya numune yanıtında %2'lik bir değişimdir.¹⁶³ Bu nedenle, DZ'nin analiz süresince stabil olduğu bulunmuştur. DZ çözeltileri çalışmamızda her gün taze olarak hazırlanmıştır.



Şekil 4.6. Metanol, B-NEJ, B-NE, B-KE ve DZ'ye ait kromatogramlar

B-NEJ: etkin madde içermeyen NE-bazlı jel; B-NE: etkin madde içermeyen NE; B-KE: etkin madde içermeyen klasik emülsiyon, MeOH: metanol

Tablo 4.3. DZ için elde edilen stabilite sonuçları (n=6)

Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (Saat)	Tayin Edilen Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	SS	VK (%)
0.5	0	0.497	0.006	1.157
	24	0.497	0.005	1.086
	48	0.500	0.005	0.961
4	0	4.021	0.028	0.701
	24	4.014	0.028	0.702
	48	3.986	0.029	0.724
32	0	32.136	0.114	0.355
	24	32.102	0.086	0.267
	48	32.013	0.141	0.441

SS: Standart sapma; VK: Varyasyon katsayısı

4.3. Formülasyonların Karakterizasyon Çalışmaları

NE, NEJ ve KE formülasyonları başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan NE ve KE formülasyonları için tip tayini gerçekleştirilmiştir. Emülsiyonlarda tip tayin yöntemlerinden biri olan iletkenlik testinde bir elektrik kaynağına bağlı bir çift elektrot emülsiyona daldırılır ve akım geçerse emülsiyonun dış fazı sudur şeklinde yorum

yapılır. Y/S emülsiyonlarında yüksek iletkenlik söz konusu iken S/Y emülsiyonlarda iletkenlik çok düşüktür.^{19, 189} S/Y nanoemülsiyonlarında, iletkenlik 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ civarında iken Y/S nanoemülsiyonlarının iletkenliği dış fazın su olması ve su içeriğinin artmasına bağlı olarak 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 'nin üzerine çıkabilmektedir.^{190, 191} Bizim çalışmamızda, noniyonik ve amfoterik sürfaktan karışımı kullanıldığı için NE ve KE formülasyonlarının tip tayini bu yöntemle gerçekleştirilmiş ve B-NE, DZ-NE, B-KE ve DZ-KE formülasyonları için elde edilen iletkenlik ölçüm sonuçları sırasıyla 90.88 ± 0.58 , 90.72 ± 0.50 , 79.13 ± 0.77 ve 78.98 ± 0.88 $\mu\text{S}/\text{cm}$ olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre hazırladığımız formülasyonlar Y/S tipindedir ve literatür sonuçları ile uyum göstermektedir.¹⁹⁰⁻¹⁹⁴

4.3.1. Santrifüj Testi

Bölüm 3.2.4.1'de anlatıldığı şekilde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlar için santrifüj testi gerçekleştirilerek formülasyonlar faz ayrımı olup olmadığı yönünden makroskobik olarak değerlendirilmiştir. NE ve NEJ formülasyonlarında kremalaşma ve faz ayrımına rastlanmamıştır. KE formülasyonlarında ise hafif bir kremalaşma gözlemlenmiştir.

4.3.2. Damlacık Büyüklüğü, Büyüklük Dağılımı ve Zeta Potansiyel Ölçümü

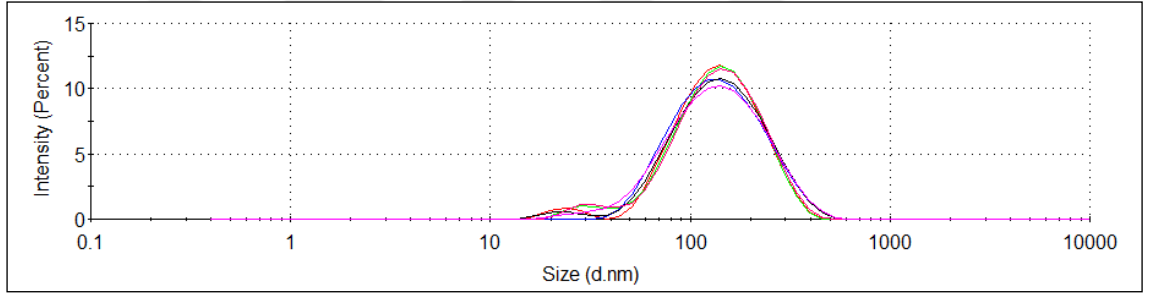
Bölüm 3.2.4.2'de anlatıldığı gibi nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jellerin damlacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımları dinamik ışık saçılımı yöntemi ile ölçülürken hazırlanmış 6 farklı örnek üzerinden 6 farklı ölçüm gerçekleştirilerek sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak Tablo 4.4'de verilmiştir. Nanoemülsiyonların önemli bir kısmının damlacık büyüklüğü dağılımı iki tepeciklidir. Bundan dolayı, damlacık büyüklüğü dağılımında en yüksek yüzde yoğunluğunu gösteren pik değerinin ortalaması alınır.¹⁶ Ayrıca, formülasyonlara ait zeta potansiyel değerleri tespit edilmiş ve Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. NE ve NEJ formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=6)

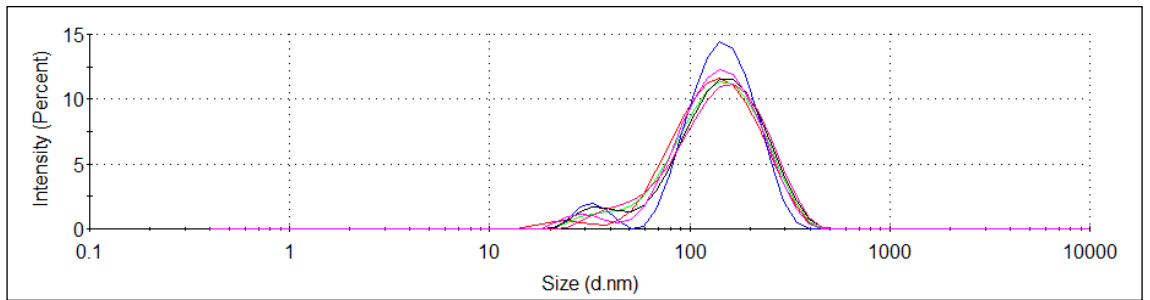
Formülasyon	Damlacık boyutu ($\bar{X} \pm SS$; nm)	PDI ($\bar{X} \pm SS$)	Zeta Potansiyel ($\bar{X} \pm SS$; mV)
B-NE	151.12 \pm 2.70	0.222 \pm 0.004	-22.57 \pm 0.78
DZ-NE	149.80 \pm 3.52	0.222 \pm 0.013	-19.32 \pm 1.06
B-NEJ	191.48 \pm 5.26	0.297 \pm 0.008	18.67 \pm 0.59
DZ-NEJ	200.25 \pm 11.09	0.311 \pm 0.007	19.35 \pm 0.66

X: ortalama; SS: standart sapma

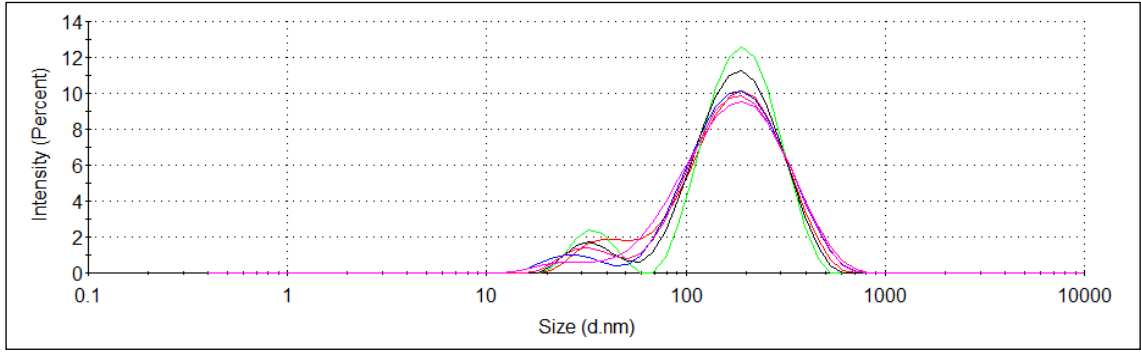
NE ve NEJ formülasyonlarının damlacık büyüklüğü dağılımlarına ait grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.7-Şekil 4.11).



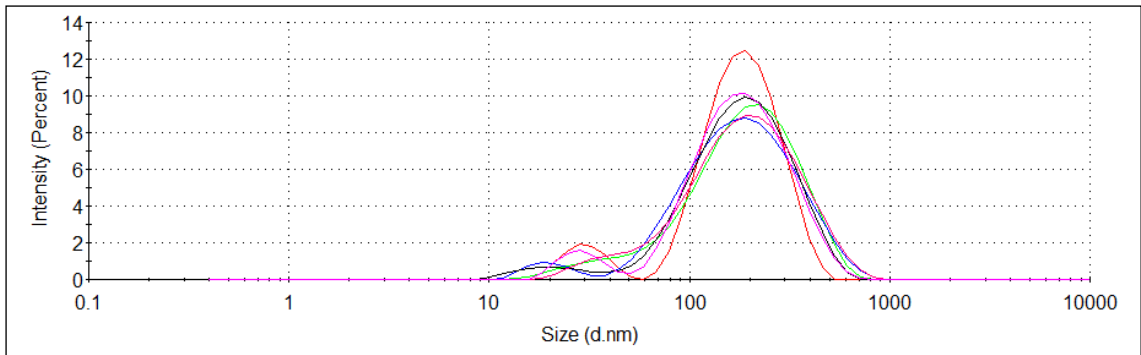
Şekil 4.7. B-NE formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı (n=6).



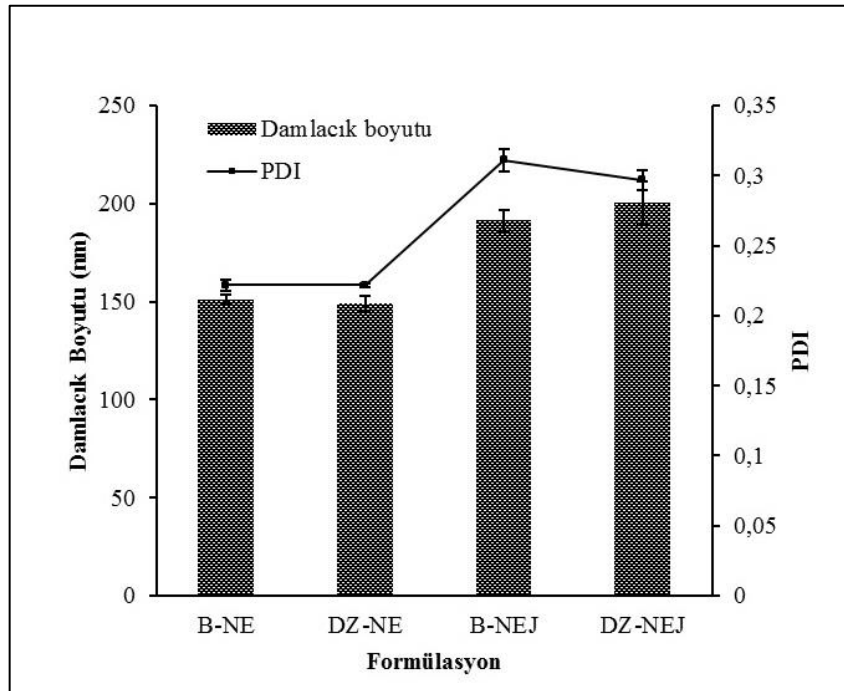
Şekil 4.8. DZ-NE formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı (n=6).



Şekil 4.9. B-NEJ formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı (n=6).



Şekil 4.10. DZ-NEJ formülasyonuna ait damlacık büyüklüğü dağılımı (n=6)



Şekil 4.11. NE ve NEJ formülasyonlarına ait damlacık büyüklüklerinin karşılaştırılması (n=6)

KE formülasyonlarının damlacık büyüklükleri ise Lazer Işık Kırınımı yöntemiyle (Malvern Mastersizer cihazı; Malvern Ins. Ltd, İngiltere) ölçülürken zeta potansiyel değerleri Malvern Nanosizer cihazı kullanılarak saptanmış ve sonuçlar Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. KE formülasyonlarına ait damlacık büyüklüğü, büyüklük dağılımı ve zeta potansiyel değerleri (n=6)

	Damlacık Boyutu (μm) ($\bar{X} \pm \text{SS}$)			$D_{[4,3]}$ (μm)	Span	Zeta Potansiyel (mV) ($\bar{X} \pm \text{SS}$)
	$d_{(0.1)}$	$d_{(0.5)}$	$d_{(0.9)}$			
B-KE	0.663 \pm 0.001	1.796 \pm 0.001	6.666 \pm 0.044	2.830 \pm 0.011	3.358 \pm 0.047	-15.50 \pm 0.75
DZ-KE	0.736 \pm 0.001	2.781 \pm 0.019	10.567 \pm 0.025	4.420 \pm 0.017	3.536 \pm 0.016	-14.67 \pm 0.43

4.3.3. pH Tayini

Bölüm 3.2.4.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan formülasyonların pH değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.6. Formülasyonlara ait pH değerleri (n=3, $\bar{X} \pm \text{SS}$)

Formülasyon	pH
B-NE	4.55 \pm 0.02
DZ-NE	4.56 \pm 0.02
B-NEJ	5.54 \pm 0.02
DZ-NEJ	5.52 \pm 0.01
B-KE	4.54 \pm 0.02
DZ-KE	4.53 \pm 0.01

X: Ortalama, SS: Standart sapma

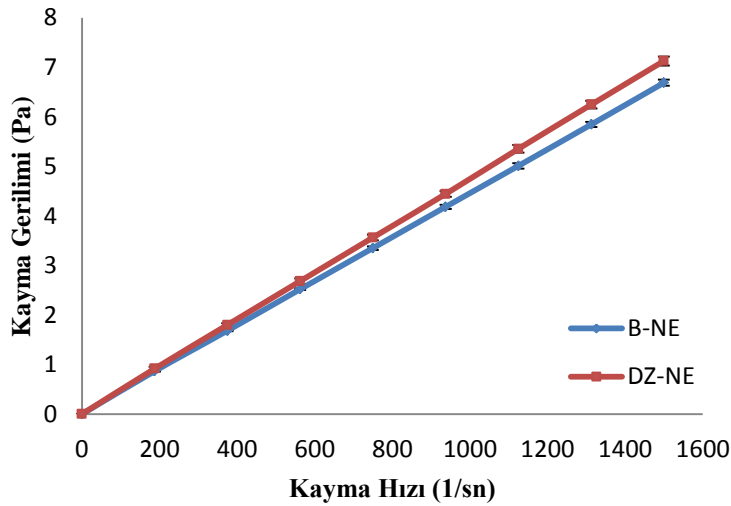
4.3.4. Reolojik Analiz

Bölüm 3.2.4.4’de anlatıldığı şekilde etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonların viskozite ölçümleri yapılmış ve sonuçlar Tablo 4.7’de, akış reogramları ise Şekil 4.12-Şekil 4.14’te gösterilmiştir.

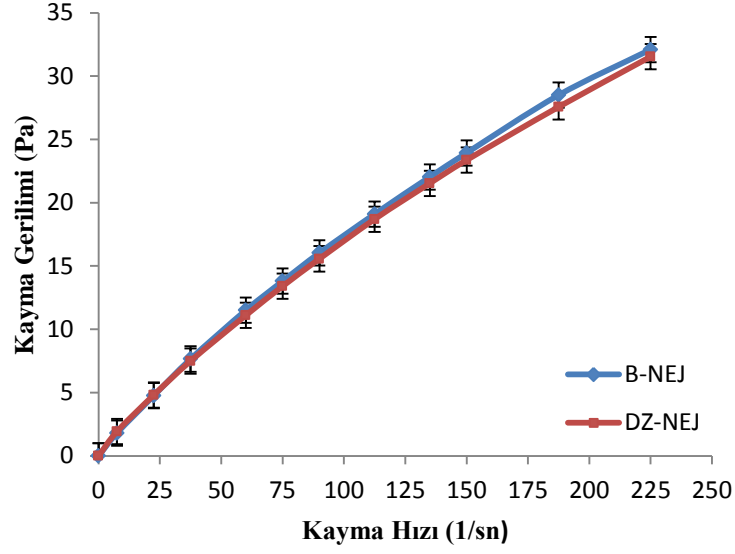
Tablo 4.7. Tüm formülasyonlara ait viskozite sonuçları (25°C’de; n=3).

Formülasyon	Viskozite (cP)
B-NE*	4.46 ± 0.05
DZ-NE*	4.75 ± 0.06
B-NEJ**	159.52 ± 0.34
DZ-NEJ**	155.76 ± 3.63
B-KE*	6.79 ± 0.03
DZ-KE*	6.87 ± 0.37

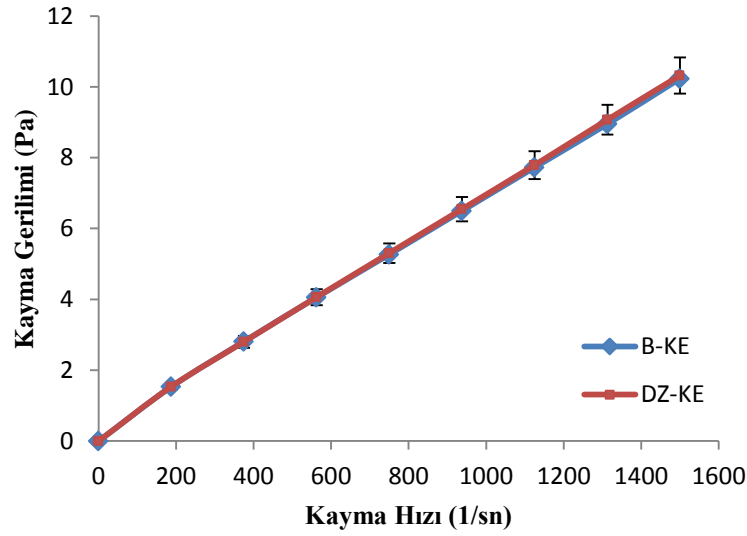
Kayma hızı: *: 1500 s⁻¹; **: 150 s⁻¹



Şekil 4.12. Nanoemülsiyon formülasyonlarına ait akış reogramları (n=3, X±SS)



Şekil 4.13. Nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonlarına ait akış reogramı (n=3, $X \pm SS$)



Şekil 4.14. Klasik emülsiyonlara ait akış reogramı (n=3, $X \pm SS$)

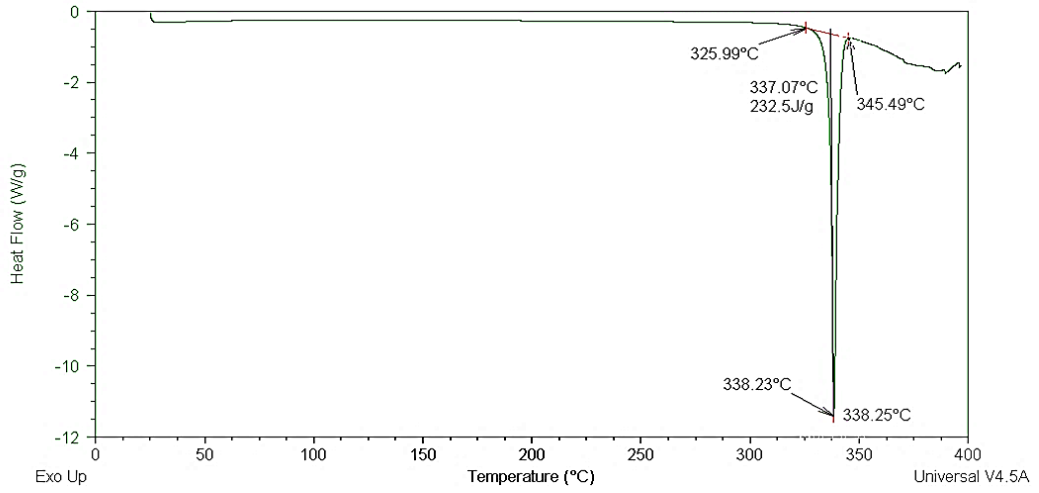
Akış özelliklerinin tayini “power law” modeliyle tanımlanmış ve her bir formülasyon için “n” değeri saptanmıştır. Aynı zamanda, çizilen kayma gerilimine karşı kayma hızı reogramlarından elde edilen ve doğrusallığı tanımlayan r^2 değerleri de bulunmuştur. Hesaplanan n ve r^2 değerleri Tablo 4.8’de verilmiştir.

Tablo 4.8. Tüm formülasyonlara ait n ve r^2 değerleri (25°C).

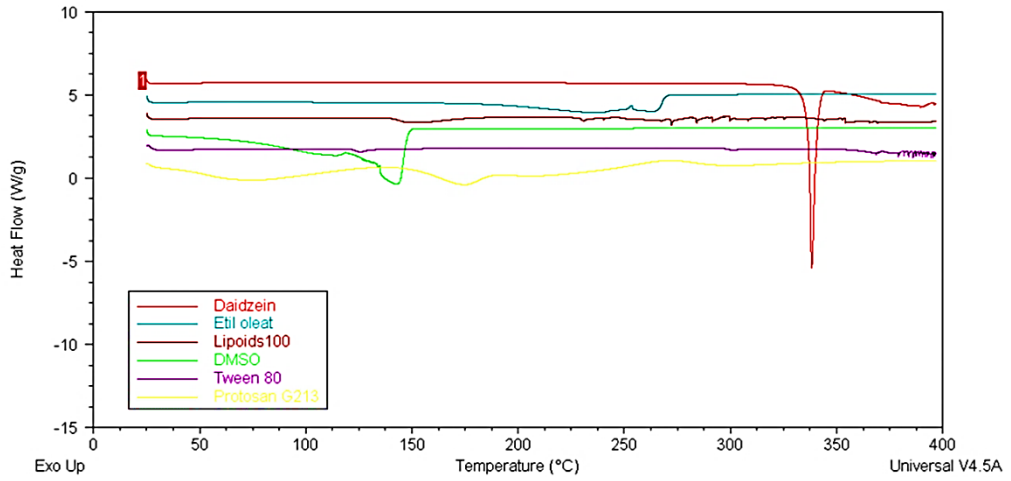
Formülasyon	n	r^2
B-NE	0.9826	0.9999
DZ-NE	0.9872	1.000
B-NEJ	0.8513	0.9871
DZ-NEJ	0.8322	0.9882
B-KE	0.9125	0.9993
DZ-KE	0.9180	0.9994

4.3.5. DSC Analizi

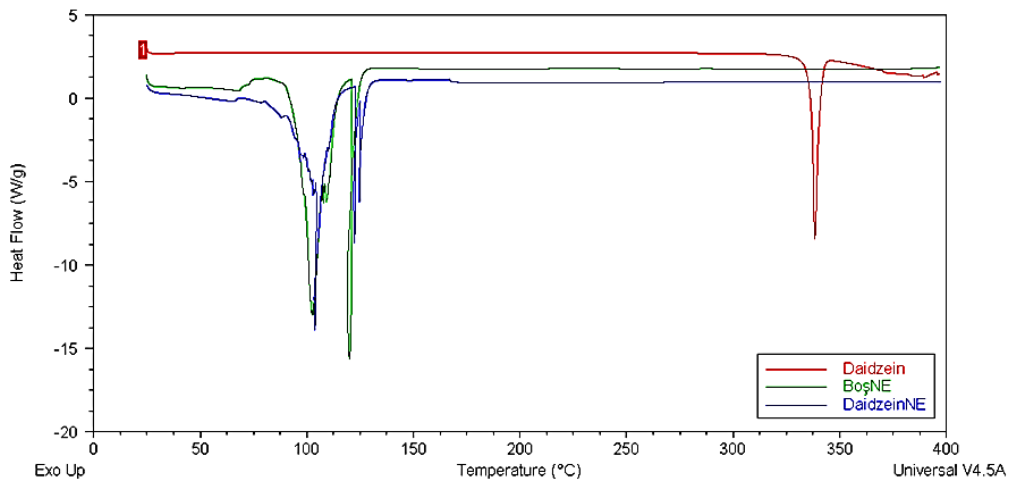
DSC, günümüzde termal yöntemler içinde en fazla kullanılan ve enerji farklarının kalorimetrik olarak ölçüldüğü bir yöntemdir. Bu yöntemde, karşılaştırma maddesine ve numuneye aynı sıcaklık programı uygulanırken her iki maddenin de aynı sıcaklıkta kalması için dışarıdan gereken miktarda ısı ilavesi yapılır. Numunede oluşan ekzotermik veya endotermik reaksiyonlar kaydedilir.¹⁹⁵ DZ’ye, formülasyon bileşenlerine ve formülasyonlara ait DSC termogramları Bölüm 3.2.4.5’de anlatıldığı gibi elde edilerek Şekil 4.15-Şekil 4.19’da gösterilmiştir. Termal analiz ile sıcaklığın fonksiyonu olarak maddenin fiziksel özelliklerinin ölçülmesi sağlanır. Bu çalışmada, DSC analizi sonucunda, DZ’nin erime derecesi 338.25 °C olarak bulunmuştur. DZ’nin temin edildiği üretici firmanın DZ için verdiği erime noktası aralığı 330-340°C’dir.⁸¹ Aynı zamanda, DZ için saptadığımız erime derecesi literatür sonuçları ile de uyumludur.^{93, 196, 197}



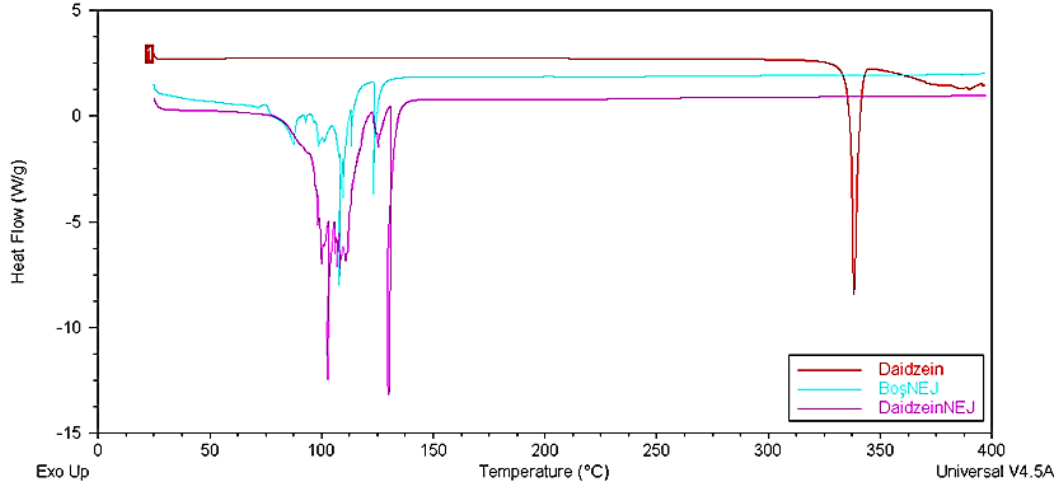
Şekil 4.15. DZ'ye ait DSC termogramı



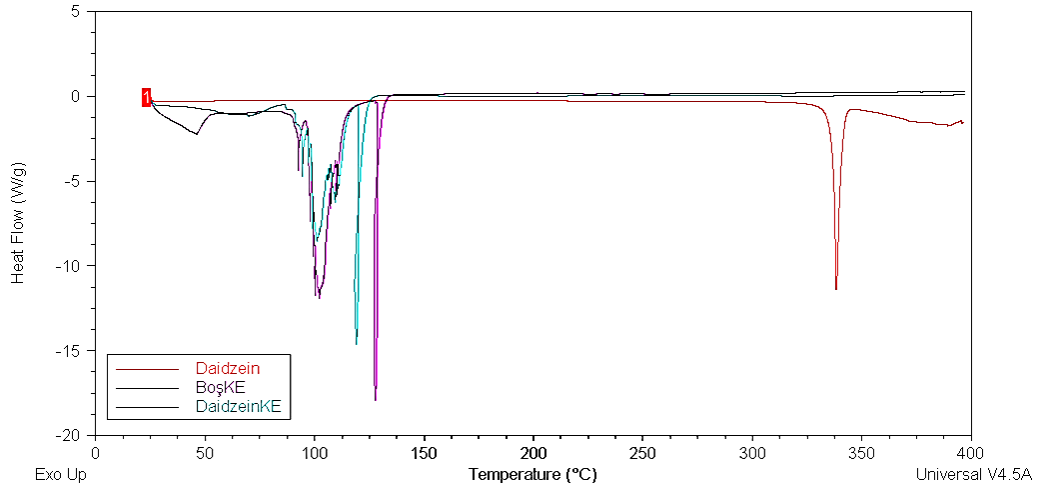
Şekil 4.16. Formülasyon bileşenlerine ait DSC termogramı



Şekil 4.17. DZ ve NE formülasyonlarına ait DSC termogramı



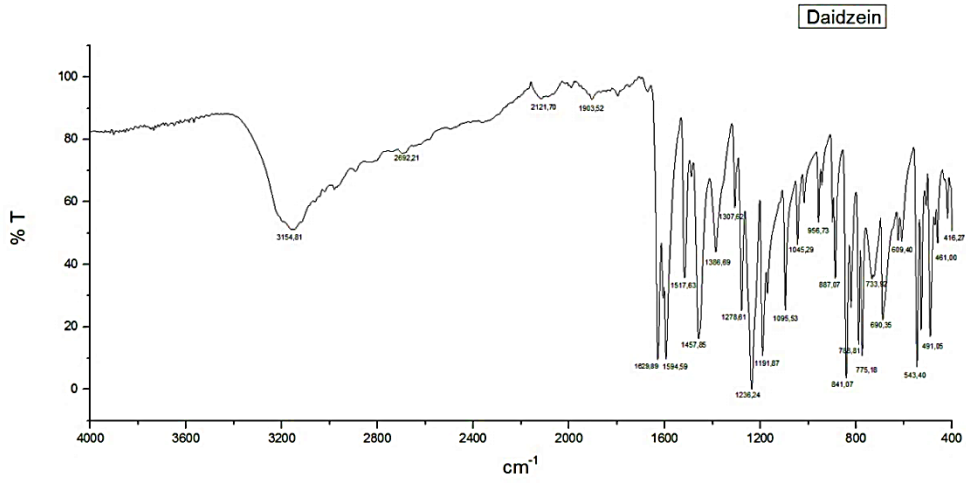
Şekil 4.18. DZ ve NEJ formülasyonlarına ait DSC termogramı



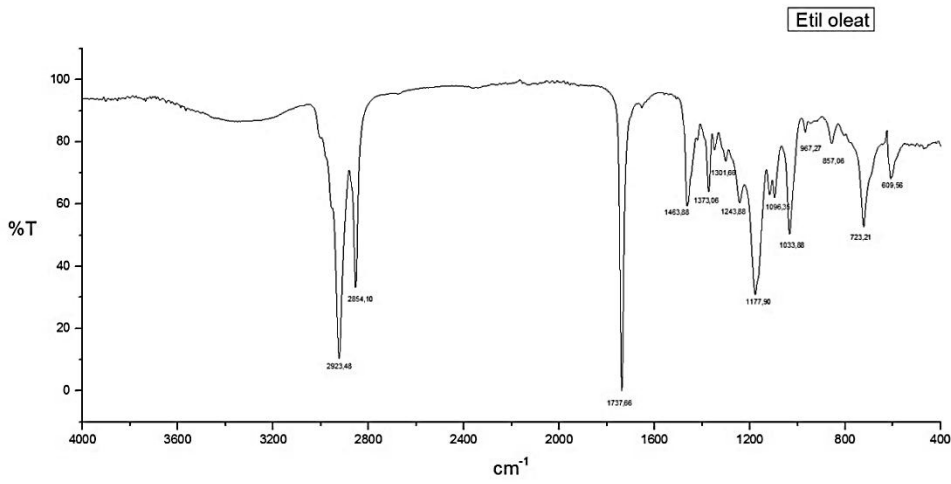
Şekil 4.19. DZ ve KE formülasyonlarına ait DSC termogramı

4.3.6. FT-IR Analizi

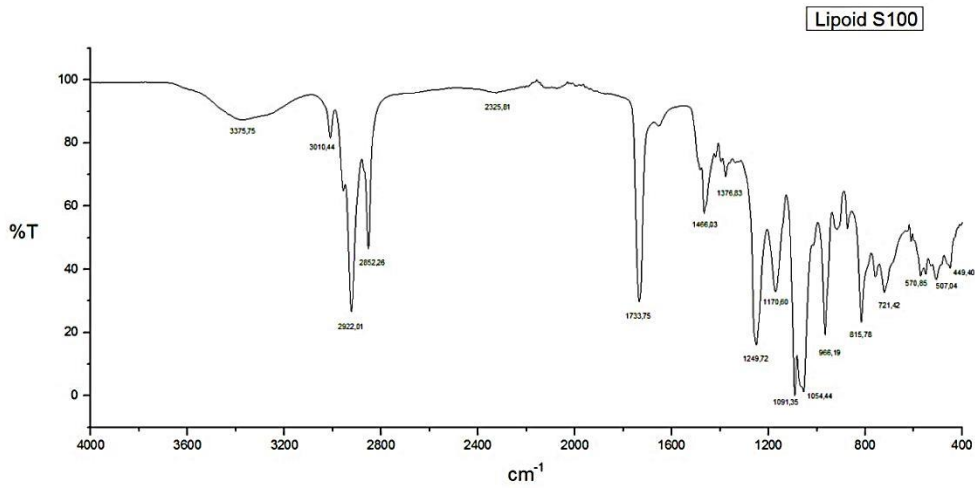
Çeşitli bağların titreşim frekansları ölçülerek yapıdaki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinebilmek ve etkin madde ile formülasyon bileşenleri arasında bir etkileşim olup olmadığını saptamak amacıyla etkin madde, formülasyon bileşenleri ve tüm formülasyonlar için FT-IR analizi gerçekleştirilmiş ve FT-IR spektrumları Şekil 4.20-Şekil 4.33'te verilmiştir.



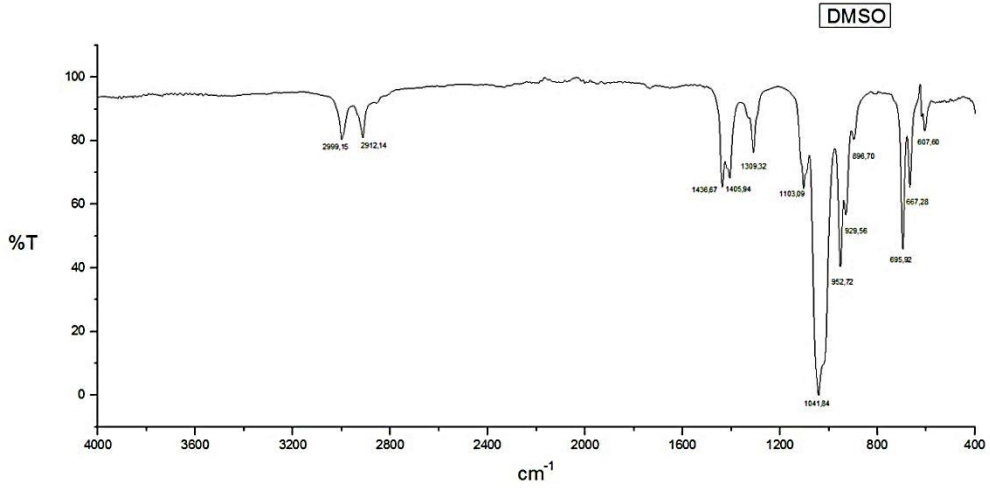
Şekil 4.20. DZ'ye ait FT-IR Spektrumu



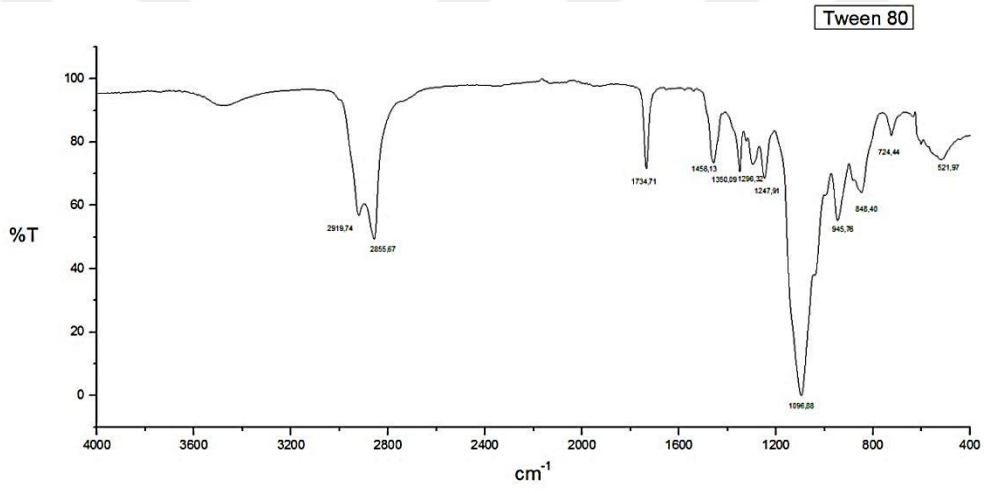
Şekil 4.21. Etil oleata ait FT-IR Spektrumu



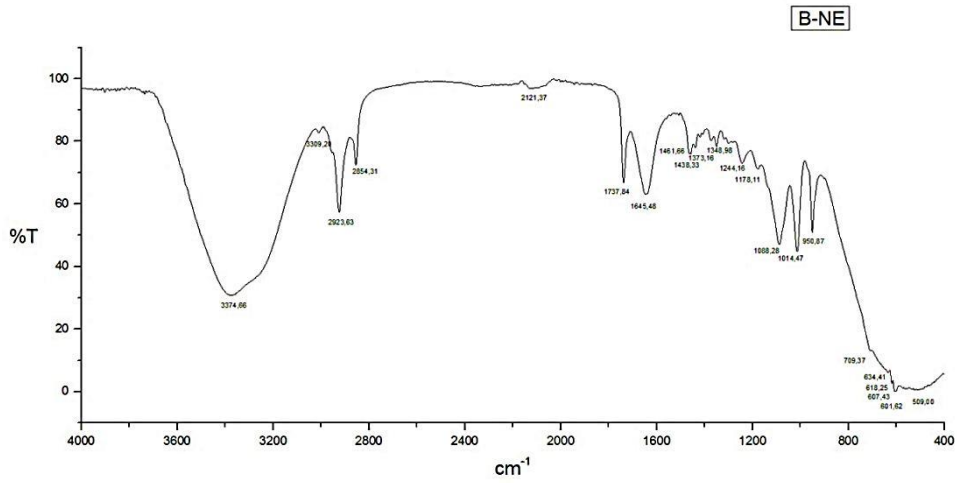
Şekil 4.22. Lipoid S100'e ait FT-IR spektrumu



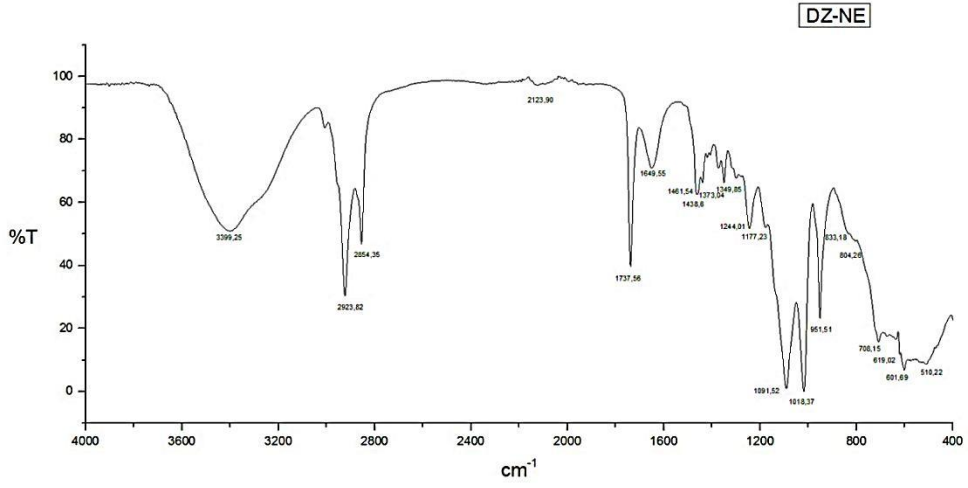
Şekil 4.23. DMSO'ya ait FT-IR Spektrumu



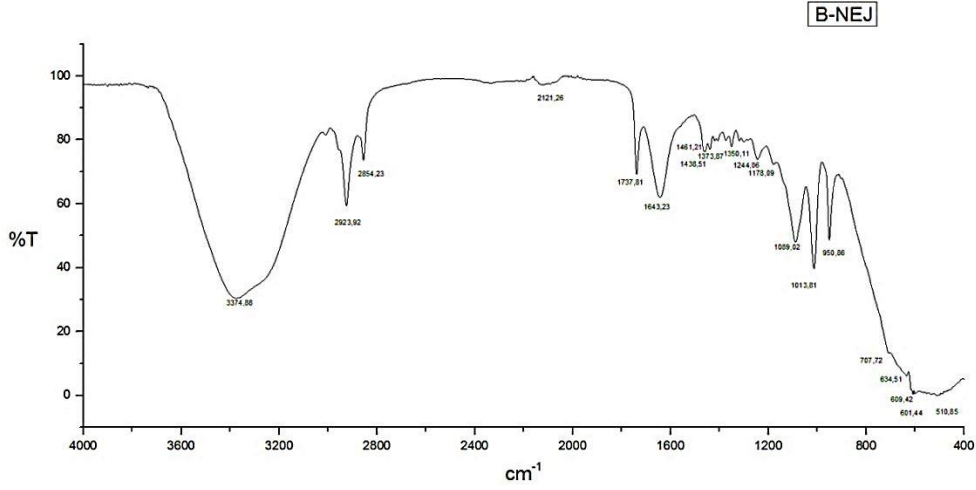
Şekil 4.24. Tween 80'e ait FT-IR spektrumu



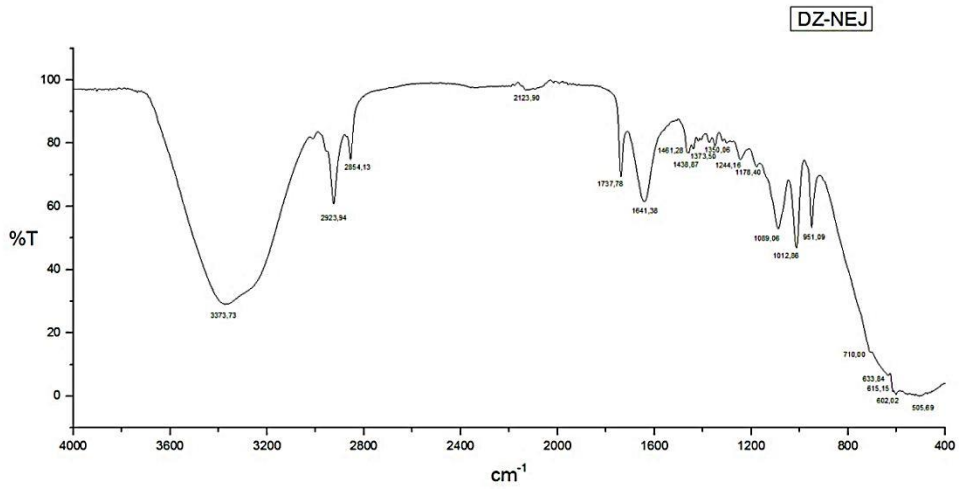
Şekil 4.25. B-NE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



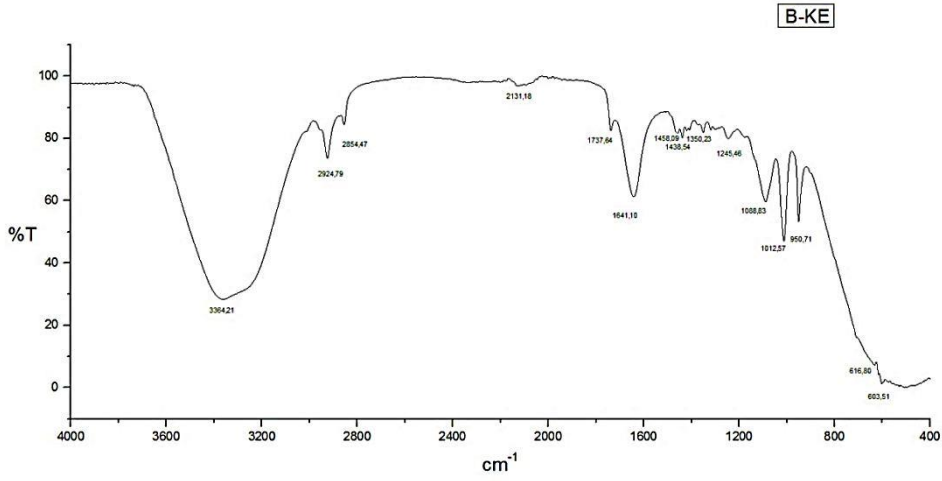
Şekil 4.26. DZ-NE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



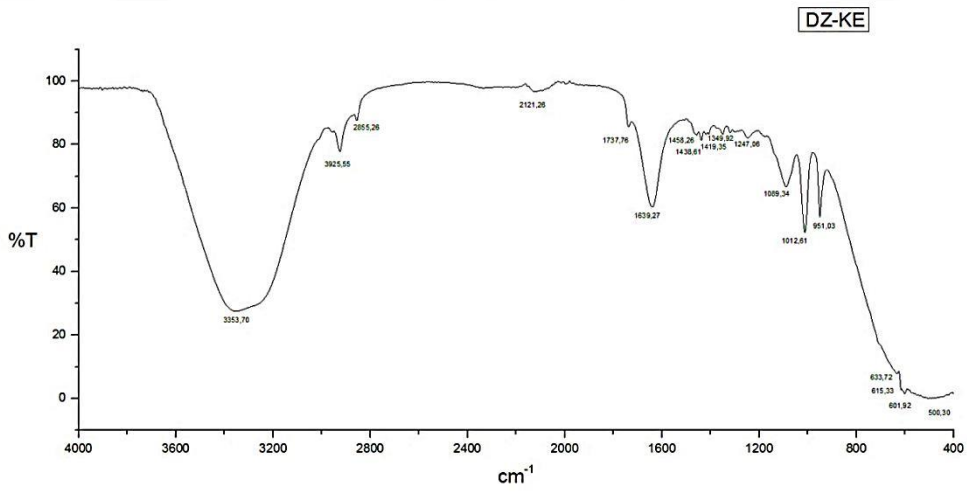
Şekil 4.27. B-NEJ formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



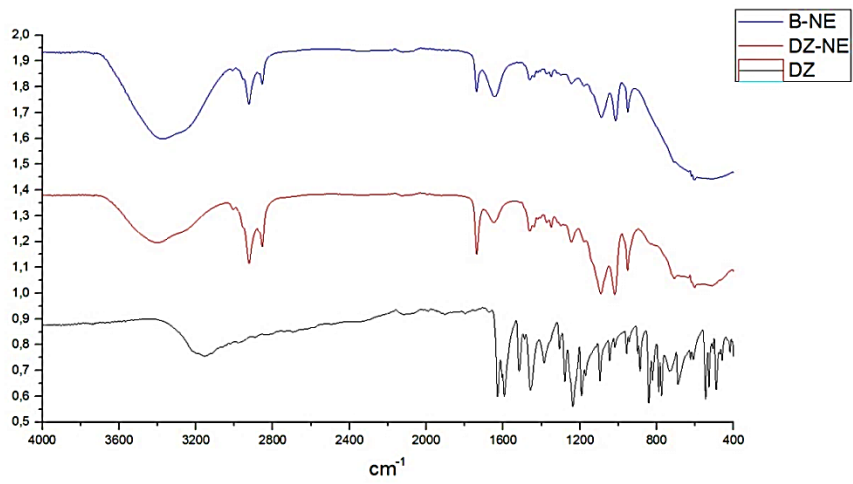
Şekil 4.28. DZ-NEJ formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



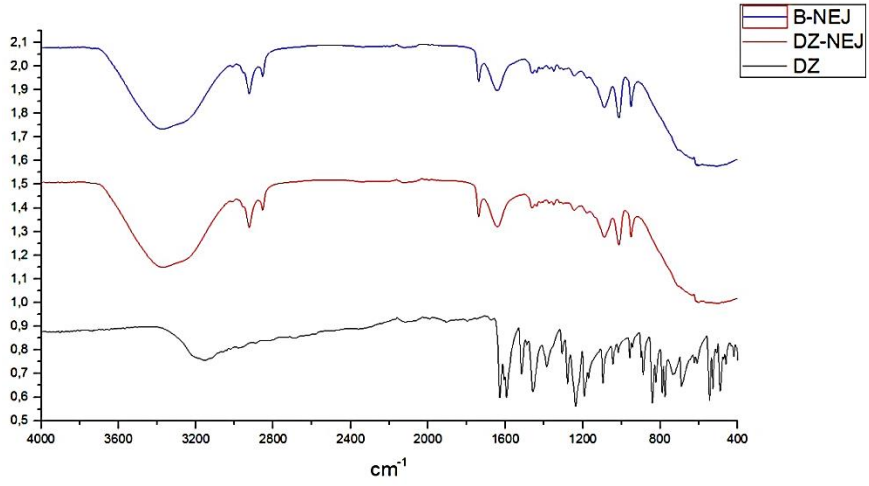
Şekil 4.29. B-KE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



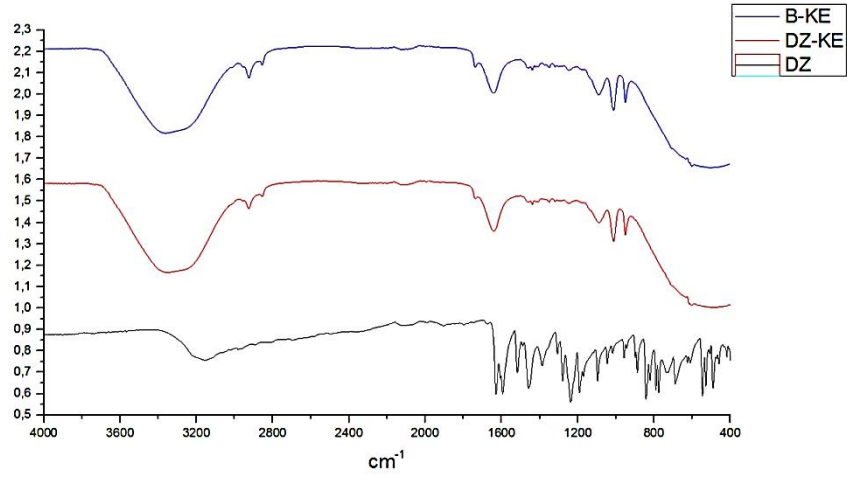
Şekil 4.30. DZ-KE formülasyonuna ait FT-IR spektrumu



Şekil 4.31. DZ ve NE formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları



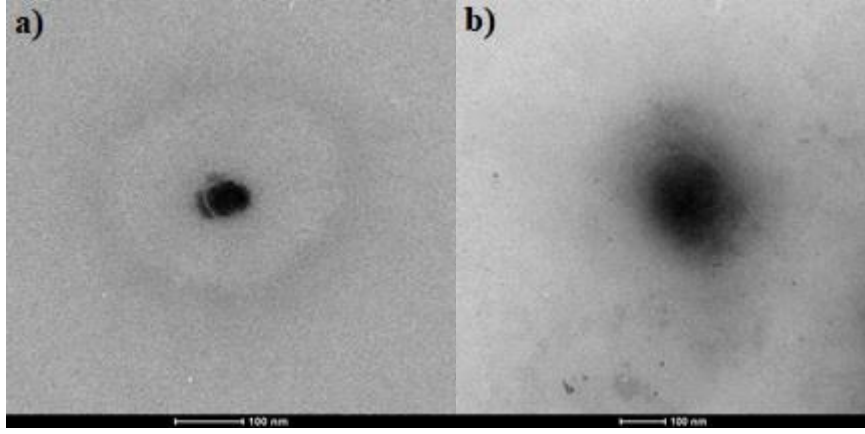
Şekil 4.32. DZ ve NE formülasyonlarına ait FT-IR spektrumları



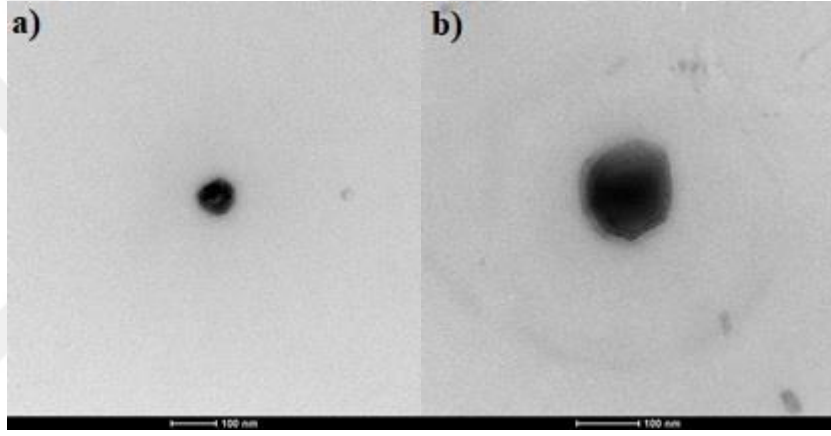
Şekil 4.33. DZ ve KE formülasyonlarına ait FT-IR spektrumu

4.3.7. Morfolojik Analiz

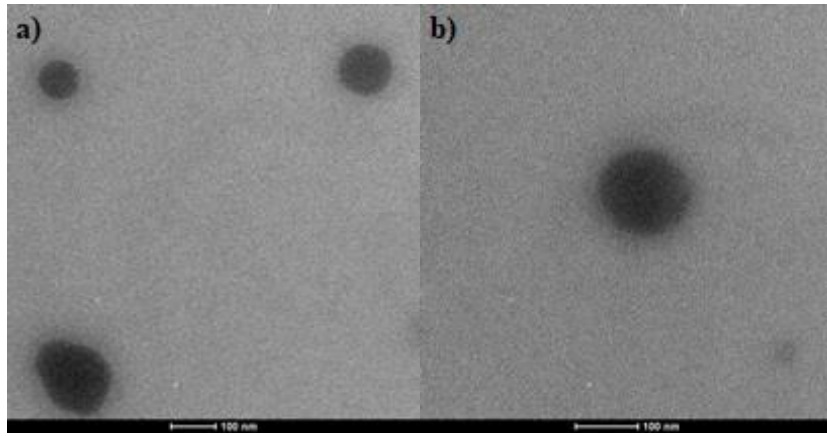
B-NE, DZ-NE, B-NEJ ve DZ-NEJ formülasyonlarına ait TEM görüntüleri Şekil 4.34-Şekil 4.37’de gösterilmiştir.



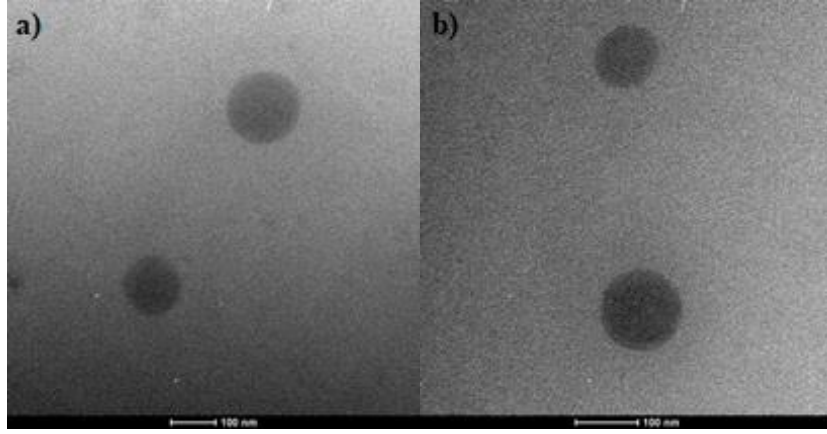
Şekil 4.34. B-NE formülasyonuna ait TEM görüntüleri (x68000 büyütme)



Şekil 4.35. DZ-NE formülasyonuna ait TEM görüntüleri [a) x49000 ve b) x68000 büyütme]



Şekil 4.36. B-NEJ formülasyonuna ait TEM görüntüleri [a) x49000 ve b) x68000 büyütme]



Şekil 4.37. DZ-NEJ formülasyonuna ait TEM görüntüleri [a) x49000 ve b) x68000 büyütme]

4.4. İn Vitro Salım Çalışması

İN vitro salım çalışmasında öncelikle DZ'nin salım ortamındaki çözünürlüğü ve stabilitesi tayin edilmiştir.

4.4.1. DZ'nin İn Vitro Salım Ortamındaki Çözünürlük Tayini

İN vitro salım ortamında DZ'nin çözünürlük tayini Bölüm 3.2.5.1'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. DZ'nin *in vitro* salım ortamındaki (%5 SDS içeren PBS pH 7.4) çözünürlük değerleri (n=3)

Zaman (Saat)	Çözünürlük ($\mu\text{g/mL}$; $\bar{X} \pm \text{SS}$)	VK (%)
1	179.922 \pm 2.355	1.309
3	180.764 \pm 1.818	1.006
5	181.054 \pm 1.252	0.692
8	182.185 \pm 0.596	0.327
10	182.696 \pm 0.960	0.525
12	182.707 \pm 0.545	0.298

X:Ortalama; SS: Standart sapma; VK: Varyasyon katsayısı

DZ için 8., 10. ve 12. saatlerde % 5 SDS içeren PBS pH 7.4'de elde edilen çözünürlük sonuçları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmamıştır ($p>0.05$). *In vitro* salım çalışmalarında sink koşulun sağlanması önemlidir ve bu koşulun sağlanabilmesi için, etkin maddenin doygunluk konsantrasyonunun salım ortamındaki konsantrasyonunun en az üç katı olması gerektiği bilgisi USP 30'da yer almaktadır.¹⁹⁸ DZ'nin % 5 SDS içeren PBS pH 7.4'deki doygunluk konsantrasyonu, salım ortamındaki teorik DZ konsantrasyonunun 2.7 katı bulunmuş ve sink koşul sınırına oldukça yakın olduğu saptanmıştır.

4.4.2. *In Vitro* Salım Koşullarında DZ'nin Stabilitesi

DZ'nin salım ortamındaki stabilitesinin değerlendirilmesi amacıyla Bölüm 3.2.5.2'de anlatıldığı gibi, DZ'nin % 5 SDS içeren PBS pH 7.4 içerisinde 32 µg/mL'lik çözeltisi hazırlanmış ve belirlenen zaman aralıklarında HPLC ile analizleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. *In vitro* salım koşullarında DZ'nin stabilitesi (n=6, X±SS)

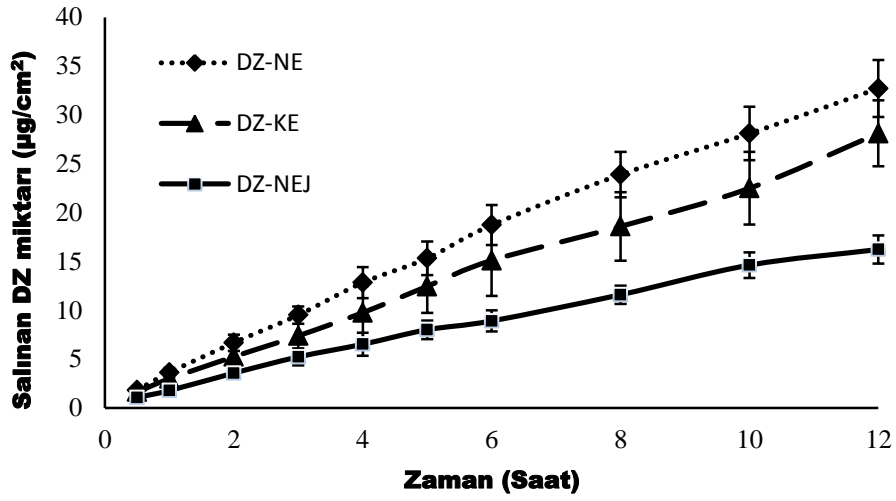
Zaman (Saat)	Hesaplanan Ortalama Konsantrasyon (µg/mL)	VK (%)
0	32.002 ± 0.205	0.641
1	32.006 ± 0.216	0.675
2	31.997 ± 0.219	0.685
3	31.984 ± 0.219	0.686
4	31.975 ± 0.218	0.683
5	31.973 ± 0.214	0.668
6	31.967 ± 0.206	0.644
8	31.957 ± 0.217	0.678
10	31.999 ± 0.099	0.310
12	32.098 ± 0.126	0.394

X:Ortalama; SS: Standart sapma; VK: Varyasyon katsayısı

4.4.3. *In Vitro* Salım Çalışması

Formülasyonlar için *in vitro* salım deneyleri Bölüm 3.2.5.3'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirilerek salım profilleri hazırlanmıştır (Şekil 4.38). Salım/çözünme grafiklerini karakterize etmek için farklı modeller kullanılmaktadır. Zamanın fonksiyonu olarak

formülasyondan salımı gerçekleşen etkin madde miktarını ilişkilendiren bir fonksiyon ile bu salım profilleri tanımlanır. Elde edilen değerlerin niceliksel yorumu, deney verilerinin bazı ölçütlerinin matematiksel bir fonksiyona dönüştürülmesi ile kolaylaşır.¹⁹⁹ Formülasyonlardan elde edilen etkin madde salım verilerinin sıfırıncı derece ve Higuchi kinetiğine uyumu, tanımlayıcılık katsayıları bulunarak değerlendirilmiş ve bulgular Tablo 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. DZ-NE (n=7), DZ-NEJ (n=8) ve DZ-KE (n=8) formülasyonlarına ait salım grafikleri (X±SS)

Tablo 4.11. Formülasyonların salım kinetiklerinin değerlendirilmesi (DZ-NE, n=7; DZ-NEJ ve DZ-KE, n=8; X±SS)

Formülasyon Kodu	Salım Kinetiği	Salım Miktarı (12. Saat) (µg/cm ²)	Salım Hızı	R ²
			*(µg/cm ² /saat)	
NE	0. derece kinetiği	32.713±2.910	2.701±0.265	0.9949
	Higuchi kinetiği		11.403±1.105	0.9815
KE	0. derece kinetiği	28.119±3.385	2.253±0.266	0.9975
	Higuchi kinetiği		9.421±1.218	0.9666
NEJ	0. derece kinetiği	16.229±1.435	1.325±0.117	0.9940
	Higuchi kinetiği		5.547±0.090	0.9810

*0. derece kinetik için salım hızı birimi; **Higuchi kineği için salım hızı birimi

Buna göre, tüm formülasyonların sıfırinci derece kinetiğe dolayısıyla etkin madde salımının kontrollü salıma daha çok uyduğu görülmektedir.

4.5. Stabilite Çalışmaları







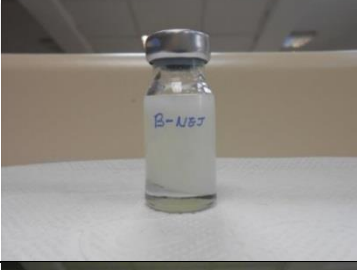
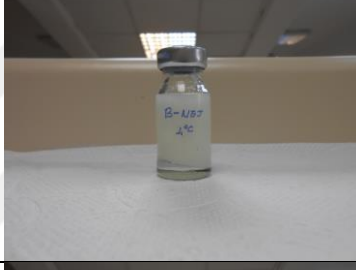




Etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonların stabiliteyi Bölüm 3.2.6'da anlatıldığı gibi makroskobik özellikleri, formülasyonlardaki etkin madde stabilitesi, partikül büyüklükleri, büyüklük dağılımları, zeta potansiyel değerleri, pH'ları ve viskoziteleri açısından değerlendirilmiştir.

4.5.1. Makroskobik İnceleme

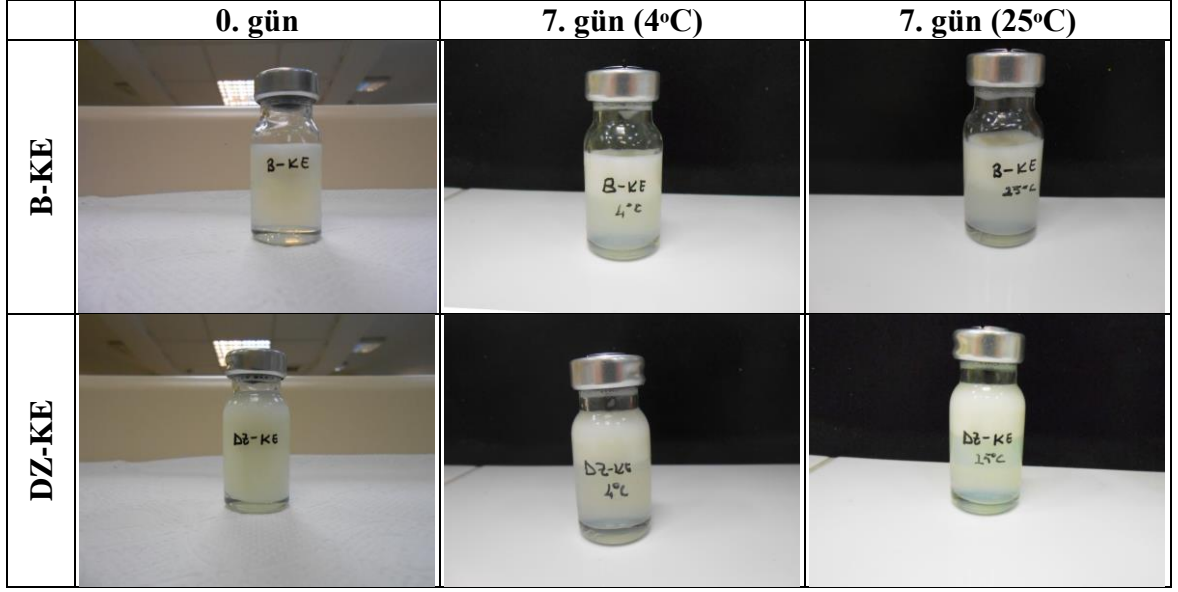
Hazırlanan NE ve NEJ formülasyonlarının 90 gün boyunca fiziksel görüntüleri takip edilmiş ve tüm örneklerin süt rengi görünümünü koruduğu ve bu sürenin sonunda formülasyonlarda herhangi bir renk değişimi ve faz ayrımı olmadığı saptanmıştır.

Klasik emülsiyonların stabilitesi takip edildiğinde ise 15. günde faz ayrımının meydana geldiği görülmüş ve KE formülasyonları için stabilite çalışması bu noktada durdurulmuştur.

NE, NEJ [taze hazırlanmış (0. gün) ve stabilite çalışmasının 90. günündeki (4 ve 25 °C) örneklerin] ve KE [taze hazırlanmış ve stabilite çalışmasının 7. günündeki (4 ve 25 °C) örneklerin] formülasyonlarına ait dijital fotoğraflar Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'da verilmiştir.

	0. gün	90. gün (4°C)	90. gün (25°C)
B-NE			
DZ-NE			
B-NEJ			
DZ-NEJ			

Şekil 4.39. NE ve NEJ formülasyonlarına ait dijital fotoğraflar



Şekil 4.40. KE formülasyonlarına ait dijital fotoğraflar

4.5.2. Damlacık Büyüklüğü ve Büyüklük Dağılımı

Hazırlanan formülasyonların 4 °C ve 25 °C’de 90 gün boyunca sürdürülen stabilite çalışmaları sırasında damlacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı saptanmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.12-Tablo 4.14’te verilmiştir.

Tablo 4.12. NE formülasyonlarına ait 90 günlük damlacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n=6; X±SS)

Zaman (Gün)	B-NE						DZ-NE					
	4 °C			25 °C			4 °C			25 °C		
	DB ^a	DB ^b	PDI	DB ^a	DB ^b	PDI	DB ^a	DB ^b	PDI	DB ^a	DB ^b	PDI
	(nm) (X±SS)	(nm) (X±SS)	(X±SS)	(nm) (X±SS)	(nm) (X±SS)	(X±SS)	(nm) (X±SS)	(nm) (X±SS)	(X±SS)	(nm) (X±SS)	(nm) (X±SS)	(X±SS)
0	116.28 ± 1.08	151.12 ± 2.70	0.220 ± 0.004	116.28 ± 1.08	151.12 ± 2.70	0.220 ± 0.004	116.98 ± 1.78	149.80 ± 3.52	0.220 ± 0.013	116.98 ± 1.78	149.80 ± 3.52	0.220 ± 0.013
3	116.20 ± 0.75	150.75 ± 3.29	0.232 ± 0.006	111.40 ± 1.20	150.57 ± 2.81	0.260 ± 0.005	115.97 ± 0.42	150.68 ± 3.77	0.230 ± 0.008	110.38 ± 1.03	149.40 ± 3.91	0.259 ± 0.008
7	115.05 ± 0.46	150.72 ± 3.56	0.239 ± 0.009	107.70 ± 0.76	147.12 ± 2.02	0.269 ± 0.004	114.70 ± 1.13	150.22 ± 1.47	0.236 ± 0.008	109.17 ± 1.20	148.57 ± 3.78	0.269 ± 0.007
15	115.37 ± 0.59	148.83 ± 4.48	0.230 ± 0.011	108.45 ± 0.40	149.28 ± 4.15	0.280 ± 0.007	114.38 ± 0.85	150.58 ± 2.72	0.243 ± 0.009	107.45 ± 0.93	147.98 ± 1.42	0.278 ± 0.007
30	116.63 ± 2.68	151.32 ± 4.28	0.251 ± 0.004	101.41 ± 2.18	148.30 ± 6.13	0.312 ± 0.005	114.87 ± 1.75	150.47 ± 3.34	0.246 ± 0.004	100.89 ± 1.18	147.37 ± 3.60	0.310 ± 0.006
60	111.98 ± 0.75	151.72 ± 2.11	0.267 ± 0.007	97.85 ± 2.40	151.40 ± 5.19	0.358 ± 0.034	110.98 ± 1.00	150.93 ± 2.71	0.272 ± 0.005	87.18 ± 1.07	142.93 ± 2.67	0.462 ± 0.017
90	111.50 ± 0.95	150.03 ± 3.53	0.266 ± 0.005	87.28 ± 0.39	316.68 ± 28.07	0.354 ± 0.007	110.58 ± 1.07	148.58 ± 4.38	0.267 ± 0.007	117.75 ± 3.09	179.57 ± 40.13	0.248 ± 0.036

DB^a: Damlacık Büyüklüğü (Z-average); DB^b: Damlacık Büyüklüğü (intensity peak mean); PDI: Polidispersite indeksi; X:Ortalama; SS: Standart Sapma

Tablo 4.13. NEJ formülasyonlarına ait 90 günlük damlacık büyüklüğü ve damlacık büyüklüğü dağılımı sonuçları (n=6; X±SS)

Zaman (Gün)	B-NEJ						DZ-NEJ					
	4 °C			25 °C			4 °C			25 °C		
	DB ^a (nm)	DB ^b (nm)	PDI	DB ^a (nm)	DB ^b (nm)	PDI	DB ^a (nm)	DB ^b (nm)	PDI	DB ^a (nm)	DB ^b (nm)	PDI
0	137.42 ± 4.42	191.48 ± 5.26	0.297 ± 0.008	137.42 ± 4.42	191.48 ± 5.26	0.297 ± 0.008	139.38 ± 3.48	200.25 ± 11.09	0.311 ± 0.007	138.38 ± 3.48	200.25 ± 11.09	0.311 ± 0.007
3	125.55 ± 1.97	212.42 ± 28.64	0.323 ± 0.035	148.22 ± 1.00	312.27 ± 21.45	0.393 ± 0.006	152.67 ± 14.50	312.15 ± 60.58	0.370 ± 0.054	149.27 ± 0.86	317.10 ± 35.44	0.397 ± 0.016
7	157.80 ± 2.36	364.77 ± 34.94	0.501 ± 0.008	157.77 ± 6.18	289.63 ± 24.73	0.486 ± 0.017	160.78 ± 2.32	349.43 ± 41.75	0.514 ± 0.011	162.27 ± 1.73	347.60 ± 32.90	0.492 ± 0.009
15	135.52 ± 2.91	220.12 ± 12.66	0.434 ± 0.046	152.53 ± 1.27	266.00 ± 18.87	0.447 ± 0.006	141.37 ± 3.13	218.10 ± 10.06	0.410 ± 0.041	155.05 ± 1.94	301.22 ± 35.50	0.449 ± 0.006
30	124.03 ± 2.47	191.47 ± 11.86	0.369 ± 0.049	133.88 ± 3.17	297.17 ± 32.74	0.429 ± 0.014	124.23 ± 2.62	213.07 ± 26.48	0.409 ± 0.035	134.38 ± 0.95	238.62 ± 30.27	0.452 ± 0.014
60	153.87 ± 1.54	264.52 ± 30.35	0.418 ± 0.054	143.23 ± 0.99	316.75 ± 12.63	0.456 ± 0.006	155.58 ± 1.32	301.43 ± 40.05	0.461 ± 0.004	146.75 ± 1.64	325.73 ± 58.56	0.470 ± 0.008
90	126.00 ± 1.14	274.68 ± 38.28	0.440 ± 0.006	124.97 ± 1.82	211.53 ± 21.55	0.415 ± 0.010	127.57 ± 0.67	291.58 ± 58.31	0.446 ± 0.007	127.98 ± 1.23	216.24 ± 20.84	0.421 ± 0.010

DB^a: Damlacık Büyüklüğü (Z-average); DB^b: Damlacık Büyüklüğü (intensity peak mean); PDI: Polidispersite indeksi; X:Ortalama; SS: Standart Sapma

Tablo 4.14. KE formülasyonuna ait 7 günlük damlacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı sonuçları (n= 6; X±SS)

Formülasyon	Sıcaklık (°C)	Zaman (Gün)	DB				Span
			D10 (µm)	D50 (µm)	D90 (µm)	D[4,3] (µm)	
B-KE	4	0	1.017±0.003	2.521±0.03	6.060±0.058	3.165±0.017	2.000±0.021
		3	0.838±0.009	2.776±0.018	5.774±0.024	3.093±0.007	1.780±0.023
		7	0.833±0.014	2.833±0.046	5.986±0.093	3.177±0.049	1.820±0.023
	25	0	1.017±0.003	2.521±0.03	6.060±0.058	3.165±0.017	2.000±0.021
		3	0.673±0.005	2.825±0.022	8.694±0.117	3.883±0.023	2.840±0.065
		7	0.639±0.006	3.059±0.030	9.954±0.179	4.322±0.038	3.061±0.088
DZ-KE	4	0	0.910±0.000	2.669±0.021	9.754±0.089	4.159±0.038	3.314±0.012
		3	0.924±0.001	2.838±0.022	10.331±0.109	4.415±0.042	3.315±0.013
		7	0.945±0.001	2.962±0.031	10.588±0.111	4.553±0.044	3.255±0.009
	25	0	0.910±0.000	2.669±0.021	9.754±0.089	4.159±0.038	3.314±0.012
		3	0.992±0.001	3.113±0.018	10.913±0.111	4.744±0.042	3.187±0.018
		7	1.087±0.017	3.515±0.068	10.885±0.142	4.553±0.044	3.255±0.009

DB: Damlacık Büyüklüğü; X:Ortalama; SS: Standart Sapma

4.5.3. Zeta Potansiyel

Hazırlanan NE ve NEJ formülasyonlarının zeta potansiyel ölçümleri 90 gün, KE formülasyonlarının ise faz ayrımından dolayı zeta potansiyel ölçümleri 7 gün boyunca belirlenen zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.15).

4.5.4. pH Tayini

Hazırlanan NE ve NEJ formülasyonlarının pH ölçümleri 90 gün, KE formülasyonlarının ise faz ayrımından dolayı pH ölçümleri 7 gün boyunca belirlenen zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.16).

4.5.5. Reolojik Analiz

Hazırlanan NE ve NEJ formülasyonlarının viskozite ölçümleri 90 gün, KE formülasyonlarının ise faz ayrımından dolayı viskozite ölçümleri 7 gün boyunca belirlenen zaman aralıklarında gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4.15. Stabilite çalışması süresince tüm formülasyonlar için tespit edilen zeta potansiyel değerleri (n=6; X±SS)

Zaman (Gün)	Zeta Potansiyel (mV)											
	B-NE		DZ-NE		B-NEJ		DZ-NEJ		B-KE		DZ-KE	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
0	-22.57 ± 0.78		-19.32 ± 1.06		18.67 ± 0.59		19.35 ± 0.66		-16.47 ± 0.54		-15.75 ± 0.47	
3	-20.33 ± 0.52	-19.93 ± 0.63	-20.03 ± 1.09	-19.67 ± 0.58	19.92 ± 0.66	19.77 ± 0.55	20.42 ± 0.64	20.32 ± 0.50	-16.35 ± 0.82	-16.13 ± 0.42	-15.63 ± 0.69	-14.48 ± 0.23
7	-20.17 ± 0.76	-19.97 ± 0.56	-19.77 ± 0.80	-21.33 ± 0.62	40.52 ± 1.58	38.50 ± 1.20	41.13 ± 1.44	38.28 ± 2.82	-14.97 ± 0.39	-14.42 ± 0.34	-15.32 ± 0.37	-13.78 ± 0.46
15	-18.75 ± 0.48	-21.98 ± 0.48	-20.10 ± 1.04	-18.98 ± 0.62	36.83 ± 0.83	35.93 ± 0.43	36.73 ± 0.77	35.92 ± 1.09	-	-	-	-
30	-23.00 ± 1.17	-19.22 ± 0.43	-22.80 ± 0.52	-23.47 ± 0.86	32.72 ± 1.71	37.00 ± 0.99	33.62 ± 1.20	36.98 ± 0.44	-	-	-	-
60	-21.83 ± 0.85	-20.32 ± 0.85	-24.18 ± 0.72	-21.33 ± 0.87	39.60 ± 1.29	37.62 ± 0.93	40.15 ± 1.54	37.47 ± 0.77	-	-	-	-
90	-21.30 ± 0.78	-21.37 ± 0.79	-20.72 ± 0.90	-20.58 ± 1.10	33.87 ± 0.96	34.30 ± 1.02	34.28 ± 0.54	33.85 ± 3.99	-	-	-	-

Tablo 4.16. Stabilite çalışması süresince tüm formülasyonlar için tespit edilen pH değerleri (n=3; X ±SS)

Zaman (Gün)	pH											
	B-NE		DZ-NE		B-NEJ		DZ-NEJ		B-KE		DZ-KE	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
0	4.55 ± 0.02		4.56 ± 0.01		5.54 ± 0.02		5.52 ± 0.01		4.54 ± 0.02		4.54 ± 0.03	
3	4.56 ± 0.01	4.54 ± 0.02	4.55 ± 0.01	4.55 ± 0.01	5.52 ± 0.01	5.52 ± 0.02	5.54 ± 0.02	5.53 ± 0.02	4.53 ± 0.01	4.54 ± 0.02	4.55 ± 0.01	4.54 ± 0.02
7	4.54 ± 0.02	4.55 ± 0.02	4.55 ± 0.02	4.56 ± 0.02	5.53 ± 0.02	5.52 ± 0.01	5.55 ± 0.01	5.53 ± 0.01	4.55 ± 0.02	4.55 ± 0.02	4.53 ± 0.01	4.52 ± 0.01
15	4.54 ± 0.01	4.56 ± 0.01	4.54 ± 0.01	4.55 ± 0.01	5.55 ± 0.01	5.54 ± 0.02	5.56 ± 0.01	5.55 ± 0.01	-	-	-	-
30	4.53 ± 0.01	4.52 ± 0.01	4.54 ± 0.02	4.52 ± 0.01	5.54 ± 0.01	5.53 ± 0.01	5.55 ± 0.02	5.55 ± 0.01	-	-	-	-
60	4.52 ± 0.01	4.52 ± 0.01	4.51 ± 0.01	4.52 ± 0.01	5.55 ± 0.01	5.56 ± 0.00	5.55 ± 0.01	5.55 ± 0.02	-	-	-	-
90	4.50 ± 0.01	4.51 ± 0.01	4.51 ± 0.01	4.50 ± 0.01	5.56 ± 0.02	5.55 ± 0.02	5.56 ± 0.01	5.55 ± 0.01	-	-	-	-

Tablo 4.17. Stabilite çalışması süresince tüm formülasyonlar için tespit edilen viskozite değerleri (n=3; X ±SS)

Zaman (Gün)	Viskozite (cP)											
	B-NE*		DZ-NE*		B-NEJ**		DZ-NEJ**		B-KE*		DZ-KE*	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
0	4.46 ± 0.05		4.75 ± 0.06		169.61 ± 0.38		166.11 ± 5.13		6.47 ± 0.07		6.52 ± 0.03	
3	4.65 ± 0.04	4.64 ± 0.04	4.87 ± 0.03	4.79 ± 0.10	170.11 ± 2.43	170.40 ± 3.46	172.66 ± 2.10	173.31 ± 1.00	7.19 ± 0.08	7.90 ± 0.05	7.21 ± 0.03	7.98 ± 0.07
7	4.68 ± 0.01	4.75 ± 0.16	4.87 ± 0.09	4.86 ± 0.05	170.26 ± 3.60	174.69 ± 2.63	173.53 ± 2.31	168.88 ± 1.20	7.34 ± 0.04	9.03 ± 0.06	7.41 ± 0.09	9.13 ± 0.02
15	4.57 ± 0.08	4.54 ± 0.07	4.72 ± 0.09	4.74 ± 0.02	171.93 ± 2.97	163.43 ± 2.81	173.46 ± 5.17	166.84 ± 0.50	-	-	-	-
30	4.43 ± 0.10	4.46 ± 0.05	4.54 ± 0.09	4.43 ± 0.03	170.04 ± 2.43	160.16 ± 3.06	172.88 ± 6.00	165.39 ± 5.52	-	-	-	-
60	4.20 ± 0.03	4.68 ± 0.08	4.36 ± 0.04	4.46 ± 0.06	169.31 ± 1.53	158.78 ± 2.33	169.46 ± 3.63	162.19 ± 2.08	-	-	-	-
90	4.33 ± 0.05	5.09 ± 0.04	4.57 ± 0.05	5.55 ± 0.05	168.59 ± 3.50	159.50 ± 2.96	170.84 ± 4.17	163.21 ± 2.80	-	-	-	-

* 1500 sn⁻¹ kayma hızında; **112.5 sn⁻¹ kayma hızında elde edilen ölçüm sonuçları

4.5.6. Etkin Madde Stabilitesi

Etkin madde içeren NE ve NEJ formülasyonlarındaki DZ miktarı 90 gün boyunca belirli aralıklarla tespit edilerek formülasyonda kalan DZ yüzdesi hesaplanmıştır (Tablo 4.18). KE formülasyonlarında ise faz ayrımı meydana geldiğinden bu işlemler 7 gün boyunca gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.18. Farklı sıcaklık ve zaman aralıklarında tüm formülasyonlar için tespit edilen etkin madde yüzdeleri (n=6; X ± SS)

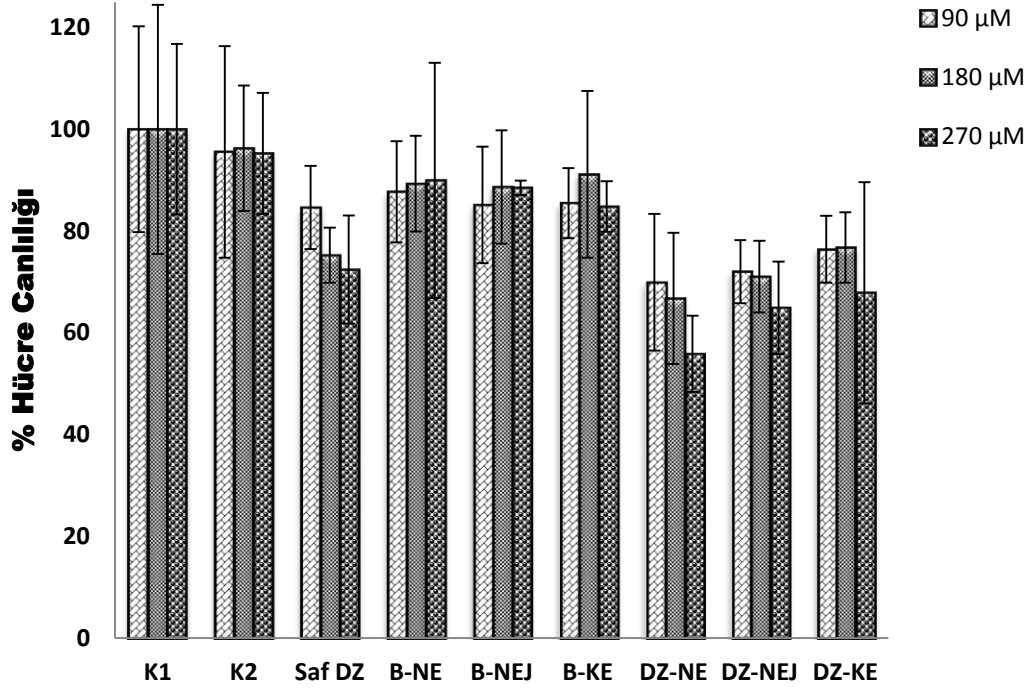
Zaman (Gün)	Formülasyonlardaki Etkin Madde Miktarı (%)					
	DZ-NE		DZ-NEJ		DZ-KE	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
0	100		100		100	
3	99.933 ± 0.663	98.267 ± 1.003	99.567 ± 0.213	98.311 ± 0.411	99.793 ± 0.445	98.781 ± 0.570
7	97.840 ± 0.478	94.852 ± 0.684	98.621 ± 0.252	95.219 ± 0.342	97.018 ± 0.671	94.224 ± 0.070
15	96.825 ± 1.135	90.207 ± 0.495	98.011 ± 0.355	92.693 ± 0.677	-	-
30	89.311 ± 0.850	83.017 ± 1.093	90.085 ± 0.641	85.529 ± 0.650	-	-
60	67.438 ± 0.305	63.153 ± 0.377	73.616 ± 0.443	67.846 ± 0.350	-	-
90	64.189 ± 1.045	59.733 ± 0.515	65.902 ± 0.434	61.357 ± 0.535	-	-

4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.6.1. Melanoma Hücre Hattında Sitotoksikite Çalışması

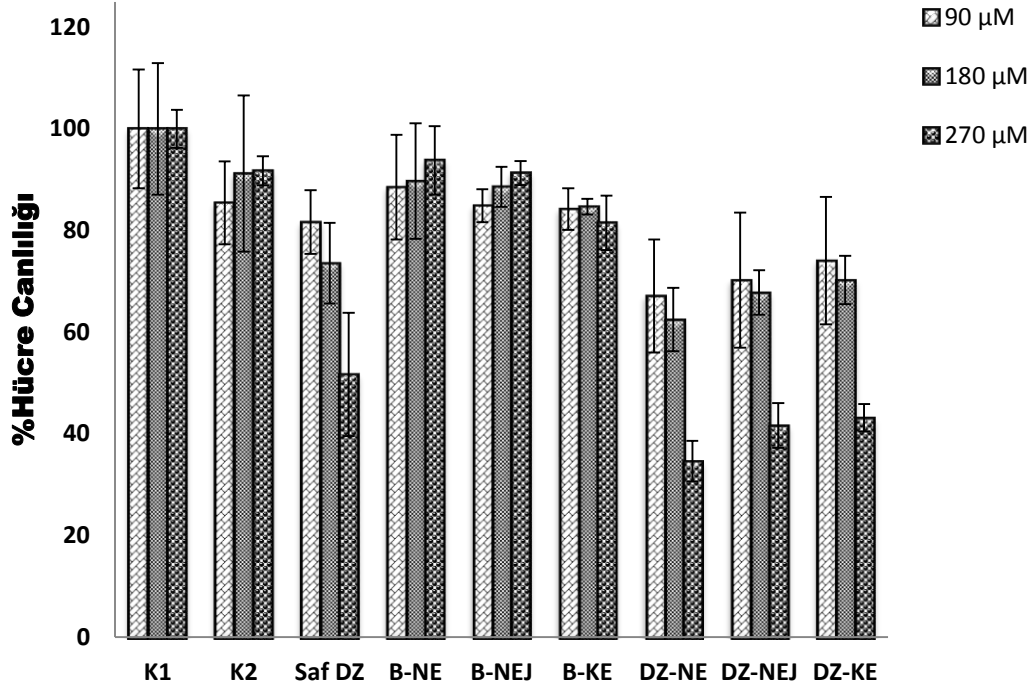
Etkin madde içeren ve içermeyen tüm formülasyonların ve saf etkin maddenin sitotoksik etkisi SK-MEL 30/An1 (Human Melanoma) hücre dizisi kullanılarak ve MTT testi gerçekleştirilerek saptanmıştır. Formülasyonlara ve etkin maddeye 24 ve 48 saat

maruziyet sonrası tespit edilen % hücre canlılığı sonuçları sırasıyla Şekil 4.41 ve Şekil 4.42’de gösterilmiştir.



Şekil 4.41. Saf DZ ve formülasyonların 24 saatlik inkübasyon sonrası melanoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

K1: Kültür ortamı ilave edilen hücreler; K2: %2 DMSO içeren hücre kültür ortamı ilave edilen hücreler; Saf DZ: saf etkin maddenin %2 DMSO içeren hücre kültür ortamındaki çözeltisi; B-NE: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon; B-NEJ: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon bazlı jel; B-KE: Etkin madde içermeyen klasik emülsiyon; DZ-NE: Daidzein içeren nanoemülsiyon; DZ-NEJ: Daidzein içeren nanoemülsiyon bazlı jel; DZ-KE: Daidzein içeren klasik emülsiyon. Formülasyonlar için hücre kültür ortamı ile gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

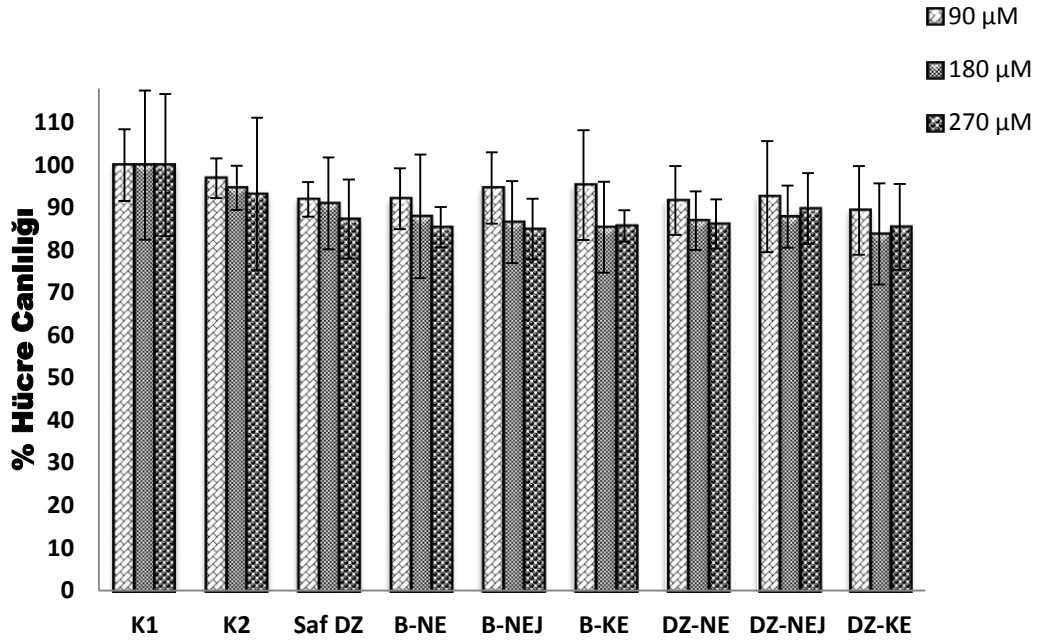


Şekil 4.42. Saf DZ ve formülasyonların 48 saatlik inkübasyon sonrası melanoma hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

K1: Kültür ortamı ilave edilen hücreler; K2: %2 DMSO içeren hücre kültür ortamı ilave edilen hücreler; Saf DZ: saf etkin maddenin %2 DMSO içeren hücre kültür ortamındaki çözeltisi; B-NE: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon; B-NEJ: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon bazlı jel; B-KE: Etkin madde içermeyen klasik emülsiyon; DZ-NE: Daidzein içeren nanoemülsiyon; DZ-NEJ: Daidzein içeren nanoemülsiyon bazlı jel; DZ-KE: Daidzein içeren klasik emülsiyon. Formülasyonlar için hücre kültür ortamı ile gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

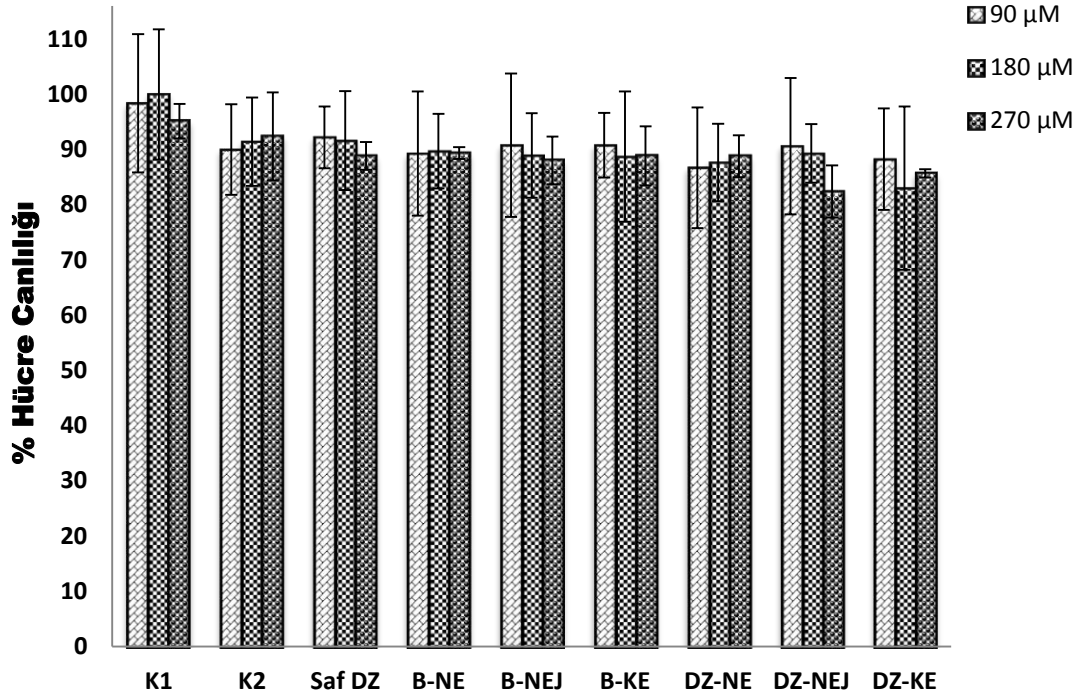
4.6.2. Fibroblast Hücre Hattında Sitotoksikite Çalışması

Etkin madde içeren ve içermeyen tüm formülasyonların ve saf DZ'nin sitotoksik etkisi normal fibroblast (PCS-201-012) hücre dizisi kullanılarak ve MTT testi gerçekleştirilerek saptanmıştır. Formülasyonlara ve DZ'ye 24 ve 48 saat maruziyet sonrası tespit edilen % hücre canlılığı sonuçları sırasıyla Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'de gösterilmiştir.



Şekil 4.43. Saf DZ ve formülasyonların 24 saatlik inkübasyon sonrası fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

K1: Kültür ortamı ilave edilen hücreler; K2: %2 DMSO içeren hücre kültür ortamı ilave edilen hücreler; Saf DZ: saf etkin maddenin %2 DMSO içeren hücre kültür ortamındaki çözeltisi; B-NE: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon; B-NEJ: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon bazlı jel; B-KE: Etkin madde içermeyen klasik emülsiyon; DZ-NE: Daidzein içeren nanoemülsiyon; DZ-NEJ: Daidzein içeren nanoemülsiyon bazlı jel; DZ-KE: Daidzein içeren klasik emülsiyon. Formülasyonlar için hücre kültür ortamı ile gerekli seyreltmeler yapılmıştır.



Şekil 4.44. Saf DZ ve formülasyonların 48 saatlik inkübasyon sonrası fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri

K1: Kültür ortamı ilave edilen hücreler; K2: %2 DMSO içeren hücre kültür ortamı ilave edilen hücreler; Saf DZ: saf etkin maddenin %2 DMSO içeren hücre kültür ortamındaki çözeltisi; B-NE: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon; B-NEJ: Etkin madde içermeyen nanoemülsiyon bazlı jel; B-KE: Etkin madde içermeyen klasik emülsiyon; DZ-NE: Daidzein içeren nanoemülsiyon; DZ-NEJ: Daidzein içeren nanoemülsiyon bazlı jel; DZ-KE: Daidzein içeren klasik emülsiyon. Formülasyonlar için hücre kültür ortamı ile gerekli seyreltmeler yapılmıştır.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda hızla gelişen nanoteknoloji eczacılık alanını da etkilemiş ve nano-taşıyıcı sistemlerin ortaya çıkmasına olanak sağlamıştır. Bu sistemlerle etkin maddenin çözünürlüğünün, biyoyararlanımının ve stabilitesinin artırılması, daha az doz ile daha etkin bir tedavi sağlanması, yan etkilerin ve dozlama sıklığının azaltılması ve böylece hasta uyuncunun artırılması mümkün olmuştur. Nano-boyutta yeni taşıyıcı sistemlerin hazırlanması, hem farmasötik hem de kozmetik araştırmaların ilgi odağı haline gelmiştir.²⁰⁰

Nanoemülsiyonların, hidrofobik maddelerin büyük miktarlarını çözme kapasiteleri, hidrolize ve enzimatik bozunmaya karşı etkin maddeleri koruma yetenekleri ve farklı yollarla (topikal, parenteral, oral vb.) kullanıma uygun olmaları onları ideal ilaç taşıyıcı sistemlerden birisi haline getirmiştir. Metastabil sistemler olmaları klasik emülsiyonlara göre önemli üstünlüklerinden birisidir. Çok küçük damlacık boyutu (nano boyut) başka bir deyişle çok geniş yüzeylerarası alana sahip olmaları nanoemülsiyonlara farklı optik özellikler ve olağandışı elastik davranış gibi bazı çok ilginç fiziksel özellikler kazandırmaktadır. Aynı zamanda, nanoemülsiyonlar etkin maddelerin emilimini artırarak biyoyararlanımlarını iyileştirmektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalar, etkin maddelerin dermal ve transdermal olarak taşınmasında nanoemülsiyon formülasyonlarının oldukça faydalı olduğunu göstermiştir.^{201, 202}

Nano-boyutlu sistemler geniş bir arayüzey alana sahiptir ve bu durum etkin maddelerin taşınma/permeabilite özelliklerini iyileştirmektedir. Bu sistemler, derinin spesifik tabakalarına etkin maddelerin kontrollü bir şekilde taşınması için de kullanılmaktadır.²⁰³ Nanoemülsiyonların hazırlanması, düşük çözünürlüğe sahip etkin maddelerin deriden penetrasyonunun ve etki bölgesinde kalma süresinin artırılması ve nihayetinde yan etkilerin azaltılması açısından umut verici bir yaklaşımdır.²⁰⁴ Yapılan

bir çalışmada, 5-aminolevülinik asit (5-ALA) içeren nanoemülsiyon formülasyonu, aktinik keratozun fotodinamik tedavisi için hazırlanmış ve 5-ALA'nın deriden penetrasyonu artmış, daha iyi bir tedavi etkinliği elde edilmiş ve lezyon alanında küçülmüştür.²⁰⁵ Silva ve ark.¹⁷¹ tarafından genistein içeren topikal nanoemülsiyon formülasyonları (damlacık boyutu 230-280 nm olan) lesitin, orta zincir uzunluğunda trigliseritler veya oktildodekanol kullanılarak kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi ile hazırlanmıştır. Genistein yağ fazına ilave edilmiş ve genisteinin yaklaşık %100 formülasyonda (1 mg/mL) yer aldığı bildirilmiştir. Franz difüzyon hücreleri ve domuz kulak derisi kullanılarak gerçekleştirilen permeasyon çalışmasında, genisteinin nanoemülsiyondan yavaş bir permeasyon profili gösterdiği saptanmıştır.

Kendiliğinden emülsifikasyon yöntemi ile genistein içeren nanoemülsiyonların (damlacık büyüklüğü <250 nm, negatif zeta potansiyele sahip) hazırlandığı bir çalışmada ise nanoemülsiyon viskozitesinin topikal uygulamaya uygun hale getirilmesi için akrilik asit hidrojelleri geliştirilmiştir. Hidrojellerin psödoplastik akış davranışı sergilediği saptanmış ve domuz kulak derisi kullanılarak, Franz difüzyon hücrelerinde gerçekleştirilen permeasyon çalışmalarında ise deriden yavaş bir permeasyon profili elde edilmiştir. Genistein-yüklü nanoemülsiyon içeren hidrojellerin, isoflavonların cilde uygulanmasında umut verici bir yaklaşım olduğu vurgulanmıştır.¹¹⁹ Nanoemülsiyonlar birçok üstünlüğüne rağmen topikal uygulamada, düşük viskozite ile ilişkili yayılma problemleri ve cilt üzerinde kısa kalış süresi gibi sakıncalarla karşı karşıyadır. Bu tür sakıncalar, topikal uygulama için nanoemülsiyonların kullanımını kısıtlar. Nanoemülsiyonu bir jelleştirme sistemine dahil etmek, bu sorunun üstesinden gelmek için bir strateji olarak geliştirilmiştir. Jeller, koloidal katı partikül ağında yüksek miktarlarda sulu veya hidroalkolik yapılar kullanılarak üretilir. Böyle bir ağ, daha yüksek sulu yapının varlığı nedeniyle krem veya merhemlere kıyasla etkin maddelerin

daha yüksek oranda çözünmesine ve kolay bir şekilde salımının gerçekleşmesine olanak sağlar. Hidrojellere hidrofobik moleküllerin yüklenmesinde sınırlamalar söz konusudur. Nanoemülyon bazlı jeller (“nanoemulgel”) nanoemülsiyon ve jel yapılarının biraraya getirilmesi ile hazırlanır ve böylece, hem nanoemülsiyonların hem de hidrojellerin sakıncalarının aşılması açısından önemlidir.²⁰⁶ Nanoemülsiyon-bazlı jeller nanoemülsiyon ve bir jelleştirme sistemi olmak üzere iki ayrı yapıdan oluşur; Nanoemülsiyonlar, etkin madde taşıyıcısı olarak görev yapar. Jeller sıvı emilimini takiben şişen polimerlerden oluşur. Genel olarak, nanoemülsiyon bazlı bir jel formülasyonunun ana bileşenlerini sulu faz (örn: saf su, alkol), yağ fazı (örn: bitkisel yağlar, yağ asitleri, yağ alkolleri), emülgatör (örn: Tween 80, Span 80), Jel oluşturucu ajanlar (karbapol 934, karbapol 940, hidroksi propil metil selüloz (HPMC), HPMC-2910), koruyucular (benzoik asit, benzalkonyum klorür vb.), antioksidanlar (bütil hidroksi anisol, bütil hidroksi toluen vb.), humektanlar (gliserin, propilen glikol) oluşturur. Yağ fazında etkin maddeyi içeren nanoemülsiyonun jel yapısına ilavesi hidrofobik moleküllerin bir hidrojele dahil edilmesini mümkün kılmaktadır. Diğer yandan, jelleştirme sistemi, nanoemülsiyonun topikal olarak uygulanabilir hale gelmesi için viskozitesini artırır. Karbomer 980, karbomer 940, karbomer 934, ksantan zamkı ve karragenan gibi çeşitli biyouyumlu jel oluşturucu ajanlar kullanılmaktadır.²⁰⁶ Topikal nanoemülsiyon bazlı jeller, yağlı his bırakmamaları, irritasyona neden olmamaları ve daha iyi etkin madde salım özelliklerinden dolayı hasta uyuncunun iyileştirilmesi potansiyeline sahiptirler. Ayrıca, jel formülasyonlarından etkin madde salımı merhem ve kremlere göre daha hızlı gerçekleşir.²⁰⁶ Nanoemülsiyon bazlı jellere karşı artan ilgi, hidrojel matrisinin kıvamından ve homojen davranışından kaynaklanmaktadır.^{206, 207} Bazı sakıncalarına rağmen, nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonu, gelecekte lipofilik

etkin maddelerin topikal olarak uygulanmasına yönelik umut vadeden potansiyel bir aday olarak düşünülebilir.²⁰⁶

Cilt kanseri insidansı (melanoma ve melanoma olmayan) son yıllarda artmaktadır. Derinin renk yapan hücrelerinin kanseri olan melanoma daha az sıklıkta görülmekle birlikte yüksek mortaliteye sahip olmasından dolayı erken tanı ve tedaviye hızlı erişim önemlidir. UV ışınlarına maruziyet melanoma riskini artırmaktadır. Melanoma, nispeten yüksek metastaz eğilimi gösteren agresif kanserlerden biri olarak bilinir.²⁰⁸ Özellikle, ozonun koruyucu etkisinin azalması, daha fazla UV ışınının dünya yüzeyine ulaşmasını sağlamaktadır. Ozon seviyesinde % 10'luk bir düşüşün ilave 300000 melanoma olmayan ve 4500 melanoma cilt kanseri vakası ile sonuçlanacağı tahmin edilmektedir.²⁰⁹

Cilt kanserinin veya ciltle ilgili diğer patolojik durumların tedavisine yönelik veya bu durumlara karşı korunma sağlamak amacıyla farklı özelliklere sahip etkin maddeleri/doğal bileşikleri içerecek şekilde nanoemülsiyon veya nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonlarının geliştirilmesi için son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılmaktadır.^{66, 67, 210-214}

Pham ve ark.²¹⁰ cilt kanserine karşı tokotrienol bazlı nanoemülsiyon formülasyonu geliştirmişler ve insan kutanöz karsinomasının iki farklı hücre modelinde, hazırlanan bu nanoemülsiyonların belirgin şekilde daha güçlü sitotoksik etki gösterdiğini saptamışlardır.

Zararlı UVB ışınlarına kronik maruziyetten kaynaklanan kutanöz patolojilere karşı etkin korunmanın sağlanması önemli bir gerekliliktir. Kemoterapötik/koruyucu doğal bileşiklerin (izoflavonlar) etkinliğini iyileştirmek için cilde uygulanmak üzere Brownlow ve ark.²¹¹ tarafından nanoemülsiyon formülasyonu hazırlanmıştır. Cildin UVB ışınlarından korunması amacıyla hazırlanan ortalama damlacık boyutu <150 nm,

zeta potansiyeli -30 mV civarında olan vitamin E ile zenginleştirilmiş genistein içeren nanoemülsiyon formülasyonlarının (sıvı ve krem şekillerinde) yavaş salım gösterdiği, Fibroblast L929 hücreleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında UVB ışınlarına maruziyeti takiben nanoemülsiyon formülasyonunun genistein-propilen glikol karışımına göre hücre canlılığında anlamlı bir şekilde düzelmeye sağladığı ve UVB ışınlarına karşı genisteinin çok düşük konsantrasyonlarda (6.5 µg/mL kadar düşük) bile koruyucu özellik gösterdiği saptanmıştır.²¹¹

İzoflavonlar sadece potansiyel kimyasal koruyucular değil, aynı zamanda önemli terapötik doğal ajanlar haline gelmişlerdir. A375 melanoma hücrelerinde soya fasulyesi ekstresinin (daidzein, genistein, aminoasit/peptid içeriği yüksek) antiproliferatif ve proapoptotik özellikleri değerlendirilmiş, ekstrenin (1.5-1.9 mg/mL; 24 saat) doz bağımlı olarak kanser hücre büyümesini inhibe ettiği ve hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Hücrelere ekstre uygulanması, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) yıkılımının indüksiyonu, kaspaz-3, -7 ve -8'in aktivasyonu, tümör nekrozis faktör ailesinin bir üyesi olan TRAIL ve onun reseptörü DR4'ün artmış ekspresyonu ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, ekstre uygulamasının, IKK'nın fosforilasyonu ve aktivasyonu, IκBα'nın degradasyonu ve p65/NF-κB'nin çekirdeğe translokasyonu ve A375'in ekstre ile indüklenen apoptozu için NF-κB'nin yolağının uyarılmasının gerekli olduğu gösterilmiştir.²¹⁵

DZ antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanserojen aktivitelere sahiptir. DZ'nin kanser oluşumunun önlenmesinde ve aynı zamanda kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmesinden dolayı da kanser tedavisinde faydalı olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur.^{97, 98, 117, 121, 216-221} DZ, hücre döngüsü ilerlemesini kontrol eden genlerin modülasyonunu gerçekleştirerek kanser hücrelerinin büyümesini inhibe etmektedir.^{97, 98,}

117, 121, 216-221

UV ile indüklenen COX-2 ekspresyonu, inflamasyon ve ödem oluşumunda, keratinosit çoğalmasında, epidermal hiperplazide ve ayrıca, oksidatif DNA hasarı oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Polifenolik bir bileşik olan DZ'nin, UV ile indüklenen serbest radikal oluşumunun ve lipid peroksidasyonunun, yani, fotoyaşlanma ve cilt kanseri gibi kronik değişikliklerle/patolojik durumlarla ilgili olayların önlenmesinde yararlı bir bileşik olduğu ve topikal uygulandığında cildi UV ışınlarının açığa çıkardığı bu reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarlara karşı koruduğu raporlanmıştır.^{83, 97, 98, 101} DZ'nin UVB-indüklenmiş cilt kanseri üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada DZ'nin ana metabolitinin (7,3',4'-trihidroksiizoflavon) UVB-indüklenmiş COX-2 ekspresyonunu inhibe ettiği ve cilt kanseri için potansiyel kimyasal koruyucu ajan olabileceği belirtilmiştir.¹²⁰ DZ'nin melanom cilt kanseri üzerindeki etkileri incelendiğinde ise DZ'nin S fazında hücre sayısını artırdığı, G(1) fazında ise hücre sayısını azalttığı ve melanom tedavisinde kullanım potansiyeli olduğu vurgulanmıştır.¹²¹

DZ içeren farklı taşıyıcı sistemlerin (nanoyapılı lipit taşıyıcı-PLGA nanofiberleri, lipit nanotaşıyıcılar, kitosan mikroküreleri, PLGA nanopartikülleri, mikroemülsiyon, katı lipit nanopartikülleri ve amfifilik jel) hazırlandığı yapılan literatür taramasında tespit edilmiştir.^{89, 93, 95, 113, 116, 222-224} Ancak, cilt kanserine yönelik DZ içeren nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonlarının hazırlanması ile ilgili bir çalışma bulunamamıştır.

Bu nedenlerle, çalışmamızda melanoma tedavisine yönelik olarak DZ içeren nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jel, klasik emülsiyon formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonlar için *in vitro* karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, insan melanoma ve normal dermal fibroblast hücreleri üzerinde hazırlanan bu sistemlerin sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir

Bu çalışmada, öncelikle etkin maddenin fizikokimyasal karakterizasyonunu gerçekleştirmek üzere FTIR ve UV spektrumları ve DSC termogramı alınmıştır.

Yukarıda ifade edildiği gibi DZ'nin kimyasal yapısı başlıca antioksidan ve antikanserojen etkileri olmak üzere biyolojik etkilerinin ortaya çıkmasında son derece önemlidir. DZ (7-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one)'nin fonksiyonel gruplarını belirlemek üzere FTIR spektrumu alınmış ve aromatik yapının, heterosiklik yapıda ketonun (R-CO-R) ve eterin (R-O-R) ve ayrıca aromatik OH (intermoleküler) gruplarının varlığını destekleyen C=C, C=O, C-O gerilme titreşimleri ve eğilme titreşimleri [C-H (aromatik yapıda) ve C=O] tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Yapı-aktivite ilişkileri üzerine yapılan çalışmalar, DZ'nin serbest radikal süpürücü aktivite göstermesi açısından B halkası 4'-OH grubunun gerekli olduğunu, buna karşın, A halkası 7-OH grubunun (Şekil 2.4) etkisinin ise daha az önemli olduğunu ortaya koymuştur.²²⁵ Çalışmamızda elde edilen FT-IR spektrum sonuçları, literatür bilgisi ile uyusmaktadır.¹⁸⁰⁻¹⁸⁴

Flavonoidlerle yapılan çalışmalarda gerçekleştirilen spektroskopik incelemelerde flavonların ve flavonollerin bir çoğunun iki büyük absorpsiyon bandı [Band I: 320-385 nm (B halka absorpsiyonu), Band II: 250-285 nm (A halka absorpsiyonu)] gösterdiği tespit edilmiştir. Flavonoidin yapısal iskeletine bağlı fonksiyonel grupların (-OH) konumları ve sayıları λ_{max} değerlerini değiştirmektedir.¹⁰⁶ İzoflavonoidlerin UV spektrumu flavanoidlerinkine benzemekle birlikte, Band II genellikle daha kısa dalga boylarındadır (245-270 nm). Bundan dolayı, UV spektroskopisi izoflavonoidlerin tanımlanması için değerlidir, çünkü karakteristik olarak absorpsiyon özellikleri diğer birçok flavonoidden farklıdır. Çoğu sınıf (örn. İzoflavonlar, izoflavanlar), A- ve B-halkaları arasında konjugasyon bulunmadığından, normalde, 245-275 nm aralığında kuvvetli bir absorpsiyon bandı, 300 nm'nin üzerinde ise zayıf bir absorpsiyon bandı

(veya absorpsiyon göstermez) gösterir.²²⁶ Bu çalışmamızda, DZ'nin λ_{\max} değeri 248.5 nm olarak saptanmıştır (Şekil 4.2). Bu sonuç, literatür sonuçları ile de uyusmaktadır.^{167,}
180, 185-187, 227

Termal analizde, numuneye kontrollü sıcaklık programı uygulanıp sıcaklığın fonksiyonu olarak maddenin fiziksel özelliklerinin ölçülmesi prensibi söz konusudur. Termal analiz yöntemlerinden biri olan DSC yönteminde, kontrollü bir sıcaklık programı uygulanarak, referansa ve numuneye ısı akışı arasındaki farkın sıcaklığın fonksiyonu olarak incelenmesi esasına dayanır. Bu yöntemde, numune ve referans sıcaklığı aynı tutulur eğer sıcaklık farkı oluşursa bu farkı gidermek için numuneye verilen enerji miktarı değiştirilir ve böylece numunede gerçekleşen faz değişimi sırasındaki ısı transfer miktarı saptanır. Erime derecesi, camsı geçiş sıcaklığı, termal dayanıklılık vb. özellikler bu yöntemle saptanabilir.²²⁸ DZ'ye ait DSC termogramı incelendiğinde erime derecesi 338.25°C olarak bulunmuştur. Bulunan değer üretici firmanın verdiği erime derecesi aralığındadır ve farklı kaynaklarda da DZ için benzer erime dereceleri elde edilmiştir.^{81, 93, 196, 197}

Birçok nedenden (iyi bilim yapılması, yöntemin istenen amaca uygunluğunun sağlanması, kalite kontrol gereksinimlerinin ve ilgili kurumların düzenlediği gerekliliklerin yerine getirilmesi vb.) dolayı analitik yöntemlerin geliştirilmesi ve geçerliliğinin (validasyonunun) gösterilmesi gerekmektedir.²²⁹ Bu amaçla, temel validasyon parametrelerinin (doğrusallık doğruluk, kesinlik, özgünlük, LOD, LOQ, stabilite) belirlenmesi gerekir.

Bu çalışmada, DZ için HPLC kullanılarak miktar tayini yöntemi geliştirilmiş ve validasyonu gerçekleştirilmiştir. Validasyon parametrelerinden olan doğrusallığın gösterilmesi amacıyla 0.5-32 µg/mL konsantrasyon aralığında yedi farklı etkin madde konsantrasyonu için (n=8/her bir konsantrasyon) çalışılmıştır. Elde edilen her seriye ait

kalibrasyon doğrularına ait eğimler karşılaştırılmış ve genel kabul kriterine uygun olarak VK değeri $<1\%$ olarak tespit edilmiştir.¹⁶³ Bununla birlikte, doğrusallık verisinin kabul edilebilirliği için çoğunlukla korelasyon katsayısı da değerlendirilir ve >0.999 'luk bir korelasyon katsayısı (tanımlayıcılık katsayısının ise 0.9999 olması) doğrusallığın sağlandığına dair kanıt olarak kabul edilir.¹⁶³ Gün içi doğruluğun ve kesinliğin tespit edilmesi amacıyla kalibrasyon doğrusu aralığında yer alan 0.5, 4 ve 32 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonları seçilmiş her bir konsantrasyondan 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanmış ve aynı gün içinde ölçümleri arka arkaya gerçekleştirilmiştir. Aynı işlem, günler arası doğruluğun ve kesinliğin tespit edilmesi amacıyla aynı konsantrasyonlarda hazırlanmış (herbir konsantrasyon için $n=6$) çözeltiler için birbirini takip eden 3 gün boyunca tekrarlanmıştır. Gün içi doğruluk için % bağıl hata değerleri hesaplanmış 0.175-1.813 aralığında, günler arası doğruluk içinse 0.261-0.700 aralığında bulunmuştur (Tablo 4.1). Bir tayin yöntemi için doğruluk kriteri, her bir konsantrasyon için % geri kazanımın 100 ± 2 olacağıdır.¹⁶³ Gün içi ve günler arası % geri kazanım değerleri 100.261-101.813 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Gün içi ve günler arası tekrar elde edilebilirlik için VK değerleri hesaplanmış ve sırasıyla, 0.302-1.517 ve 0.142-1.219 aralıklarında olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1). Yöntemin tekrar edilebilirliği için hesaplanan VK değerleri ise 0.072-0.601 aralığında bulunmuştur (Tablo 4.2). Hesaplanan % bağıl hata ve VK değerleri % 2'nin altında olduğundan geliştirilmiş yöntem için doğruluk ve kesinlik parametreleri gerçekleştirilmiştir.¹⁶³ Analitik yöntem için LOD değeri 3 ng/mL , LOQ değeri ise 10 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Özgünlük parametresi ise birtakım girişimler (fiziksel, kimyasal) varlığında analitik yöntemin sadece analizi gerçekleştirilecek etkin maddeyi ölçebilme yeteneğini göstermektedir. Örnek matriksinde bulunan bileşenlerin geliştirilen yöntem koşullarında girişime neden olup olmadığı tespit edilir.²³⁰ Bu çalışmamızda, formülasyon bileşenlerinin DZ ile

girişim yapmadığı (aynı şartlarda DZ'ye ait alıkonma süresinde herhangi bir pik vermedikleri görülmüştür) ve geliştirilen analitik yöntemin DZ'ye özgün olduğu saptanmıştır (Şekil 4.6).

Tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde etmek için, numune çözeltilerinin, standartların ve reaktiflerin stabilitesi analitik yöntem validasyon çalışmalarını başlatmadan önce belirlenmelidir. Çözeltilerin, sıklıkla örneğin alet arızalarından veya otomatik örnekleyciler kullanılarak gece boyunca gerçekleştirilen analizlerden kaynaklanan gecikmelere izin verecek şekilde stabil olması gerekmektedir. Örnekler ve standartlar, en az 24 saat süreyle (ihtiyaca göre değişmekle birlikte) test edilmelidir ve taze hazırlanmış standartlarla kıyaslanarak bileşenlerin niceliği belirlenmelidir. Analiz yöntemleri için bir stabilite kriteri, numunenin ve standart çözeltilerin tanımlanan saklama koşulları altında 24 saat stabil kalmasıdır. Kabul edilebilir stabilite, yeni hazırlanmış standartlara göre standart veya numune yanıtında %2'lik bir değişimdir.¹⁶³

Stabilite parametresi için üç farklı konsantrasyonda (0.5, 4 ve 32 µg/mL; n=6/her bir konsantrasyon) standart çözeltiler hazırlanmış ve hazırlandıktan sonra 0., 24. ve 48. saatlerde analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir konsantrasyon ve zaman için elde edilen VK değerleri < %2 olduğundan DZ'nin analiz süresince stabil kaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, DZ'nin miktar tayini için analitik yöntem geliştirilmiş ve validasyonu gerçekleştirilmiştir.

Nanoemülsiyon formülasyonları YBH yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. DZ'nin iç faz olan yağ fazına yüklenebilmesi için Y/S emülsiyonu hazırlanmıştır. Formülasyonun geliştirilmesi aşamasında etkin maddenin çözüldüğü ortamlar için literatür taraması yapılmış ve en fazla çözüldüğü ortam olan etil oleat yağ fazı olarak seçilmiştir.⁸⁹ Ancak, DZ'nin çözünürlüğünün artırılması ve başarılı bir formülasyon hazırlanabilmesi amacıyla yardımcı çözücü kullanılması gerekliliği doğmuş ve bundan

dolayı, DMSO'nun yardımcı çözücü olarak kullanılmasına karar verilmiştir. DZ, DMSO içinde çözünmektedir.^{81, 222, 231} Zayıf çözünürlüğe sahip etkin maddelerin nanoemülsiyon formülasyonlarının geliştirilmesinde yardımcı çözücüler (etanol, DMSO vb) sıklıkla kullanılmaktadır.²³²⁻²³⁴

Yüzey aktif maddeler (sürfaktan, emülgatör), bir emülsiyon formülasyonunun temel bileşenlerindedir. Bu nedenle, çalışmamızda yüzey aktif madde olarak Tween 80 ve Lipoid S100 kullanılmış ve sistemin HLB değeri 11 olarak saptanmıştır.

Tween 80 (polioksietilen sorbitan monooleat; HLB:15.0) en yaygın olarak kullanılan non-iyonik yüzey aktif maddelerdendir. Tween 80, toksik olmaması, çevre dostu ve biyouyumlu olması gibi nedenlerden dolayı cazip noniyonik bir sürfaktandır. Bancroft'un kuralına göre, Y/S emülsiyonu hazırlanması için, emülgatör dış faz içinde daha fazla çözünmelidir. Dolayısıyla, Tween 80, suda çözünür hidrofilik yapıda bir bileşik olduğundan Y/S emülsiyonu oluşturma eğilimindedir. Bu sonuç, HLB kavramını kullanarak da elde edilebilir. Bu parametreye göre 3.5-6 aralığındaki HLB değerlerinde S/Y emülsiyonlarının oluşumu ve 8-18 aralığındaki değerlerde ise Y/S emülsiyonlarının oluşumu görülür.^{192, 235-237} Lipoid S100 [soya lesitini-fosfatidilkolin (PC)], farklı formülasyonların hazırlanmasında kullanılan yaygın amfoterik (hem negatif hem de pozitif yüklü fonksiyonel gruplar içerir, düşük ve yüksek pH koşullarında katyonik ve anyonik özellik kazanır) yüzey aktif maddelerden birisidir.²³⁸⁻²³⁹ Lesitin ifadesi, hayvanların ve bitkilerin doğal bir bileşeni olan fosfolipidlerin karışımını belirtmek için kullanılır. Yumurta sarısı, lesitin birincil hayvansal kaynağıdır, ancak endüstriyel uygulamalar için pahalıdır. Lesitin, günümüzde çoğunlukla bol miktarda bulunan ve ucuz olan bitki tohumlarından (ağırlıklı olarak soya fasulyesi tohumlarından) üretilmektedir. Ham soya yağı, fosfolipidleri %1-3 oranında içerir. Bu fosfolipidler, yağ arıtımı esnasında bir ön-muamele safhasında bir yan ürün olarak ekstre edilir. Lesitin

bileşimi ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemine göre değişir. Ticari soya lesitini, yaklaşık %65-75 oranında fosfolipit (PL), %34 oranında trigliserit ve az miktarda karbohidrat, pigment, sterol ve sterol glikozitleri içermektedir. Lesitin bileşiminde yaygın olarak bulunan PL'ler PC, fosfatidiletanolamin (PE) ve fosfatidilinositol (PI)'dür. Soya lesitini yapısal özellikleri ve bileşiminden dolayı bir emülgatör, antioksidan, stabilizan, ıslatıcı ajan vb. fonksiyonları yerine getirmek üzere kullanılmaktadır. Fosfolipidlerin hücre membranlarının doğal bileşenleri olması nedeniyle, lesitin biyoyumludur ve özellikle iv emülsiyonların hazırlanmasında yaygın olarak kullanılır.²⁴⁰⁻²⁴¹ PL'ler gliserol molekülünün üçüncü karbon atomuna bağlı bir fosfat grubu içeren digliseridlerdir. PL'ler polar bir baş grubundan ve hidrofobik polar olmayan yağlı asidi yapısında kuyruk kısmından oluşurlar. Bu yapılarından dolayı yağ-su arayüzeyine adsorbe olarak arayüzey gerilimini düşürürler ve bir bariyer görevi görerek de emülsiyon damlacıklarının stabilizasyonunu sağlayabilirler. PC ve PE sırasıyla pozitif yüklü kolin ve etanolamin gruplarını ve ayrıca negatif yüklü fosfat ve karbonil gruplarını içerirler ve bundan dolayı, bunlar zwitteriyonik tipte yüzey aktif maddelerdir ve nötr pH değerlerinde elektriksel olarak nötrdürler. PE yağ içinde su (S/Y) emülsiyonlarının oluşumunu kolaylaştırma eğiliminde iken, PC, su içinde yağ (Y/S) emülsiyonlarının oluşumunu kolaylaştırma eğilimindedir. Ticari lesitinler, fosfolipidlerin ve diğer maddelerin karışımı olduğu için, yüzey etkinlikleri tüm yüzey aktif bileşenlerin bir sonucudur. PC ve PE fizyolojik pH'da emülsiyon damlacıkları üzerindeki net yüke önemli ölçüde katkıda bulunmazken, lesitin içindeki PI ve diğer anyonik bileşenler, emülsiyonun negatif yüküne ve dolayısıyla emülsiyon kararlılığına katkıda bulunurlar.²⁴⁰

Tez çalışmamızda, NEJ formülasyonlarının hazırlanması amacıyla jelleştirme ajanı olarak toksik olmayan, biyoparçalanabilir, biyoadezif özelliklere sahip doğal bir

polimer olan, irritasyona ve alerjik reaksiyonlara neden olmayan kitosanın bir türevidir (ProtasanTM UP G 213) kullanılmıştır. Bu katyonik polimer, asetil gruplarının % 75-90'ı uzaklaştırılmış, suda çözünür kitosan glutamattır. Bu polimerin fonksiyonel özellikleri, molekül ağırlığı (ortalama MA:200-600 kDa) ve deasetilasyon derecesi (%75-90) ile tanımlanmaktadır. Bu polimerin viskozitesi ise 20-200 mPa.s'dir.²⁴² Nanoemülsiyon bazlı jellerin hazırlanması amacıyla kitosanın kullanıldığı çalışmalar mevcuttur.^{243, 244}

Ayrıca, hazırlanan nanoemülsiyonların özelliklerinin karşılaştırılabilmesi amacıyla, çalışmamızda aynı bileşenler kullanılarak boş ve DZ içeren KE formülasyonları da hazırlanmıştır.

Nanoemülsiyonlar, damlacık büyüklüğü 20-200 nm olan emülsiyonlar olarak tanımlansa da, genellikle düşük yüzey aktif madde içeriğine sahip ve metastabil ise ortalama damlacık büyüklüğü <500 nm olan emülsiyonlar da nanoemülsiyon olarak kabul edilir. Küçük damlacık büyüklüğüne sahip nanoemülsiyonlar klasik emülsiyonların (mikron boyutlu damlacıklara sahip) süt beyazı renginden farklı olarak şeffaf/yarı şeffaftır. Ayrıca, nano-boyut (etkileşim için daha büyük yüzey alanı), etkin maddelerin cilt üzerinde kalıcılığının, penetrasyonunun ve lipofilik etkin maddelerin çözünürlüğünün artırılmasında nanoemülsiyonlara önemli üstünlükler sağlamaktadır. Bununla birlikte, topikal uygulamalarda nanoemülsiyonların kullanımı, klasik emülsiyonlara göre yüksek stabilitesi ve şeffaflığı/yarı şeffaflığı nedeniyle de oldukça caziptir.^{35, 204, 245} Bu tez çalışmasında, hazırlanan NE damlacık büyüklüğünün <200 nm olduğu tespit edilmiştir.

Hazırlanan tüm formülasyonların damlacık büyüklükleri, zeta potansiyel, viskozite ve pH değerleri saptanmıştır. Damlacık büyüklüğü (DB^b) ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları incelendiğinde (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5), B-NE ve DZ-NE için sırasıyla 151.12±2.70 ve 149.80±3.52 nm (p>0.05) ve -22.57±0.78 ve -19.32±1.06 mV (p<0.05);

B-NEJ ve DZ-NEJ için 191.48 ± 5.26 ve 200.25 ± 11.09 ($p > 0.05$) ve 18.67 ± 0.59 ve 19.35 ± 0.66 mV ($p > 0.05$); B-KE ve DZ-KE için 2.830 ± 0.011 ve 4.420 ± 0.017 μm ($p < 0.05$) ve -15.50 ± 0.75 ve -14.67 ± 0.43 mV ($p < 0.05$) olarak tespit edildiği görülmektedir. NE ve NEJ formülasyonlarında DZ ilavesinin damlacık büyüklüğü üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Ayrıca, NE ve NEJ formülasyonlarının polidispersite indeksinin yaklaşık ≤ 0.3 olduğu görülmüş ve damlacık boyutu dağılımının dar bir aralıkta (düşük polidispersiteye sahip) olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4).

Boş ve etkin madde içeren NE ve NEJ formülasyonlarının ortalama damlacık büyüklükleri ve zeta potansiyel değerleri karşılaştırıldığında ise jelleştirme sonrası damlacık boyutunun ve zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) bir şekilde arttığı saptanmıştır. Ancak, jel oluşumu sonrası nano-boyutun korunduğu saptanmıştır.¹⁷⁴

Bununla birlikte, nanoemülsiyonlar negatif zeta potansiyel değerlerine sahipken jel oluşumu sonrası katyonik bir polimer olan kitosan varlığı nedeniyle pozitif zeta potansiyel değerlerine sahip formülasyonlar elde edilmiştir. Emülsiyon damlacıkları farklı şekillerde (ortamdaki iyonların adsorpsiyonu, iyonik/amfoterik emülgatör kullanımı gibi) kazanabilirler. Bu tez çalışmasında hazırlanan NE ve KE formülasyonlarının negatif zeta potansiyelinin ortamda bulunan iyonlarının (OH^- , HCO_3^- vb.) Y/S ara yüzeyine adsorpsiyonu sonucu gerçekleştiği düşünülebilir.²⁴⁶ PC'ler ise pH 2 ve 3'de pozitif yük kazanırken, pH 4 civarında çoğunlukla zwitteriyonik, $\text{pH} \geq 5$ 'de ise yaklaşık tamamı zwitteriyonik özellik gösterir.²⁴⁷ Ragelle ve ark.²⁴⁸ Labrasol, Tween 80, Miglyol 812 ve lesitin (% 82.3 fosfatidilkolin içeren yumurta lesitini olan Lipoid E80) kullanarak fisetin içeren nanoemülsiyon formülasyonu hazırlamışlardır. Bu emülsiyonların damlacık boyutu 153 nm, zeta potansiyel değerleri

ise -28.4 mV olarak saptanmıştır. Negatif zeta potansiyelin Lipoid E80'in anyonik gruplarından kaynaklandığı ifade edilmiştir.

Chen ve ark.²⁴⁹ etil oleat (yağ fazı), Tween 80 (sürfaktan) ve PEG 400 (yardımcı sürfaktan) kullanarak Resveratrol içeren kendiliğinden mikro-emülsifiye sistem SMEDDS formülasyonu geliştirmişler ve negatif zeta potansiyel değerlerine sahip formülasyonlar elde etmişlerdir. Ortam pH'sının damlacık yüzeyinde iyonlaşmaya neden olduğu ve bundan dolayı zeta potansiyel üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir.

Nanosistemlerin formülasyonunda kullanılan kitosanın, katyonik doğasından dolayı pozitif zeta potansiyel değerlerine neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur.²⁵⁰⁻²⁵² Bu nedenle, NEJ formülasyonları için pozitif zeta potansiyel değerleri elde edilmiştir. Zeta potansiyel, koloidal dağılımların elektrokinetik potansiyelidir ve koloidal dağılımların stabilitesinin değerlendirilmesinde önemlidir. Benzer yüklü damlacıklar/partiküller arasındaki itme derecesinin bir göstergesidir.²⁵³ Genel kural olarak, 30 mV üzerindeki mutlak zeta potansiyel değerleri emülsiyonlar için iyi bir stabilite sağlar. Yaklaşık 20 mV, yalnızca kısa vadeli stabilite sağlar. Bu durum, düşük molekül ağırlıklı yüzey aktif maddeler ve sadece elektrostatik stabilizasyon söz konusu ise geçerlidir. Ancak, yüksek molekül ağırlıklı yüzey aktif maddeler ve sterik stabilizasyonun da söz konusu olduğu durumlarda yaklaşık 20 mV'luk zeta potansiyel değerleri de yeterli stabilizasyon sağlayabilir.^{251, 254} Noniyonik yüzey aktif maddeler (örn: Tween 80) nanoemülsiyonları, arayüzey gerilimini azaltarak stabilize ederken, aynı zamanda, damlalar arasında sterik bir stabilizasyon da sağlar.^{251, 255, 256}

Sun ve ark.²⁵⁷ tarafından sığır serum albumini içeren, Cremophor EL-35, propilen glikol ve izopropil miristat kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyon formülasyonunun zeta potansiyel değerinin -24.8 mV ve damlacık boyutunun 21.8 nm olduğu ve oldukça stabil bir sistem olarak hazırlandığı ifade edilmiştir.

Hosseini ve ark.²⁵⁸ hazırladıkları ve zeta potansiyel değeri yaklaşık -18 mV olan nanoemülsiyon formülasyonlarının 60 gün boyunca oda sıcaklığında stabil olarak kaldıklarını raporlamışlardır.

Tez çalışmamızda tüm formülasyonlar için elde edilen pH değerleri 4.53-5.54 aralığında saptanmıştır. NE ve KE formülasyonlarının pH değerleri benzer bulunmuştur ($p>0.05$). NE formülasyonlarına, %1 (a/a) Protasan UP G 213 polimerinin ilavesi ile hazırlanan NEJ formülasyonlarının pH'sı anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0.05$). Üretici firma tarafından Protasan UP G 213 için verilen pH aralığı 4.0-6.0'dır.²⁵⁹ Ayrıca, tüm formülasyonlara DZ ilavesinin pH'da değişime neden olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). Çalışmamızda elde edilen pH değerlerinin topikal uygulama için uygun olduğu saptanmıştır. Literatürde, cilt pH'sı için hepsi asidik olmak üzere ancak, geniş bir aralıkta (pH 4.0-7.0 arasında) farklı değerler rapor edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, ortalama cilt pH'sının 4.7 olduğu saptanmıştır ve bu değer (pH<5.0) diğer literatürler tarafından da desteklenmektedir.^{254, 260, 261} Bu genel varsayımın aksine, cilt yüzeyinin pH'sının 5.0-6.0 arasında olduğunu ifade eden çalışmalarda mevcuttur. pH'sı <5.0 olan cildin, bariyer fonksiyonu ve nemlendirme gibi özellikleri açısından pH'sı >5.0 olan ciltten daha iyi bir koşula sahip olduğu gösterilmiştir. Yerleşik bakteri florasının cilt üzerinde devamı içinde asidik pH (4-4.5) önemlidir.^{260, 261}

Ribeiro ve ark.²⁵⁴ nemlendirici olarak kozmetik kullanıma yönelik *Opuntia ficus-indica* (L.) ekstresi içeren Y/S nanoemülsiyon formülasyonu geliştirmişlerdir. Bu formülasyonların (damlacık boyut aralığı: 92.2 to 233.6 nm ve zeta potansiyel değerleri: (-) 26.71–(-) 47.01 mV olan) stabilite çalışmalarında stabil olduklarının saptandığı ve pH değerlerinin (5.32-5.68)'de cilt pH'sı (4.5-6.0) ile uyumlu olduğunu ifade etmişlerdir.

Bu tez kapsamında, formülasyonların akış özelliklerini belirlemek amacıyla, kayma hızı ve kayma gerilimi arasındaki ilişki belirlenmiş (Şekil 4.11-Şekil 4.13) ve farklı kayma hızlarında viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan formülasyonların akış davranışları “power law” modeliyle tanımlanmıştır. Log (kayma hızı) ve Log (kayma gerilimi) değerleri grafiğe geçirilmiş, regresyon analizi yapılmış ve akış davranış indeksi (n ; 0-1 arasında değerdir) hesaplanmıştır. Bu n değerinin 1’den küçük olması formülasyonun kayma ile incelen (viskozitesi azalan; “shear thinning”, psödoplastik) bir sistem olduğunu gösterir.²⁶²⁻²⁶⁴ Hazırlanan KE ve NEJ formülasyonları için n değerinin birden küçük olduğu görülürken, NE formülasyonları için n değerinin 1’den küçük ancak 1’e çok yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, KE ve NEJ formülasyonlarının kayma ile viskozitesi azalan sistemler (psödoplastik akış tipine uyduğu) olduğu saptanmıştır. NE formülasyonu için ise Newtonian akışa yakın bir özellik gösterdiği söylenebilir.

25 °C’de, 1500 s⁻¹ kayma hızında B-NE ve DZ-NE için viskozite değerleri sırasıyla, 4.46±0.05 ve 4.75±0.06 cP, B-KE ve DZ-KE içinse 6.79±0.03 ve 6.87±0.37 cP olarak saptanmıştır. Hazırlanan NE formülasyonlarının viskozitesinin düşük olduğu görülmektedir. NE formülasyonlarının viskozite değerlerinin düşük olması bu sistemlerin topikal olarak uygulanmasını güçleştirmektedir. Uygulama kolaylığı ve cilt üzerinde yayılabilirlik açısından NEJ formülasyonlarının hazırlanmasının önemli bir üstünlük sağladığı bilinmektedir.²⁰⁴ Bu nedenle, viskoziteyi artırmak için jelleştirme ajanı olarak %1 oranında Protasan UP G213 kullanılmış ve hazırlanan B-NEJ ve DZ-NEJ formülasyonları için 25 °C’de 150 s⁻¹’de viskozite değerleri sırasıyla 159.52±0.34 ve 155.76±3.63 cP olarak saptanmıştır. NE formülasyonlarına göre önemli bir viskozite artışı sağlanmıştır. Her formülasyon için boş ve etkin madde içeren formülasyonların viskozitesi karşılaştırıldığında DZ ilavesinin viskozitede anlamlı bir değişikliğe neden

olmadığı görülmüştür ($p>0.05$). KE ve NEJ formülasyonlarının viskozite değerleri nanoemülsiyonların viskozite değerlerinden anlamlı şekilde farklıdır ($p<0.05$).

Krahn ve ark.²⁶⁵ YBH yöntemi kullanarak izofluran içeren damlacık boyutu 150 nm, zeta potansiyeli -18 mV olan nanoemülsiyon formülasyonu hazırlamışlardır. Hazırlanan bu formülasyonun reolojik özelliklerini incelemişler, formülasyonun ortalama viskozite değerinin 4.53 ± 0.15 cP olduğunu ve akış özelliklerinin newtonian akış tipine uyduğunu saptamışlardır. Yazarlar, YBH yöntemi kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyonlarda homojenizasyon işleminin daha etkin olmasının Newtonian akış tipi görülmesinde etkili olduğunu ifade etmişlerdir.

Thomas ve ark.²⁴³ yağ fazı olarak Labrafac PG ve Triasetini, sürfaktan olarak Tween 80'i ve yardımcı sürfaktan olarak da polietilen glikol (PEG 400)'ü kullanarak kurkumin içeren nanoemülsiyon formülasyonları hazırlamışlardır. En uygun nanoemülsiyon formülasyonunun viskozitesi 78.23 cp, pH'sı ise 6.2 olarak saptanmıştır ve bu nanoemülsiyon jel hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu amaçla, biyoyumlu olması ve toksik olmaması nedeniyle kitosanın jelleştirme ajanı olarak seçildiği ve %2 konsantrasyonun uygun bir jelleşme (görsel inceleme) sağladığı raporlanmıştır. Elde edilen nanoemülsiyon bazlı jelin viskozitesi 504 cp ve pH değeri 6.4 olarak tespit edilmiştir. Bu viskozitenin uygulama kolaylığı ve jelin cilde yayılması açısından uygun bir viskozitede hazırlandığı belirtilmiştir.

Saf DZ'ye, boş ve DZ içeren tüm formülasyonlara ait DSC termogramları alınmıştır (Şekil 4.15-Şekil 4.19). Etkin maddeye ait DSC termogramı incelendiğinde DZ'nin erime derecesi ile ilgili olarak 338.25 °C'de endotermik bir pik gözlenmiştir. Hem boş hem de DZ içeren tüm formülasyonlara ait DSC termogramlarında ise 100 °C civarında suyun buharlaşmasıyla ilgili endotermik piklerin olduğu saptanmıştır. Ancak, DZ içeren NE, NEJ ve KE formülasyonlarına ait DSC termogramlarında DZ'ye ait

endotermik pik görülememiştir. Bu durum, DZ'nin moleküler düzeyde formülasyonların yağ fazında dağılmasından kaynaklanmaktadır. Benzer sonuçlar, nanoemülsiyonlar ile ilgili yapılan farklı çalışmalarda da saptanmıştır.²⁶⁶⁻²⁶⁷

Cekić ve ark.²⁶⁷ YBH yöntemini kullanarak hazırladıkları diazepam içeren nanoemülsiyonun, boş nanoemülsiyonun ve saf diazepamın DSC analizini gerçekleştirmişler ve elde ettikleri termogramları değerlendirdiklerinde saf etkin maddenin termogramında etkin maddenin erime derecesi ile ilgili olarak 134.28 °C'de keskin bir endotermik pik görüldüğünü, boş ve etkin madde içeren nanoemülsiyon formülasyonlarına ait termogramlarda ise büyük olasılıkla su buharlaşması nedeniyle 100 °C civarında geniş asimetric endotermik bir pik görüldüğü ancak etkin maddeye ait erime derecesi ile ilgili endotermik pikin görülemediği çünkü etkin maddenin nanoemülsiyonun yağ fazında moleküler düzeyde dağıldığı ifade edilmiştir.

Wadhwa ve ark.²⁶⁸ kurkumin içeren nanoemülsifiye-prekonsantre formülasyon hazırlamışlardır. Etkin madde ve kurkumin içeren formülasyonun DSC analizi gerçekleştirilmiş ve elde edilen etkin madde DSC termogramında kurkumine ait keskin bir endotermik pik 180.71 ° C'de görülmüştür ve bu pikin kurkuminin kristalinitesiyle ilgili olan erime noktasına karşılık geldiği ifade edilmiştir. Formülasyonun DSC termogramında ise kurkuminin erime noktasına karşılık gelen pikin görülemediği belirtilmiştir.

DSC ile elde edilen sonuçları doğrulamak üzere saf DZ, boş ve DZ içeren tüm formülasyonların FTIR analizi de gerçekleştirilmiştir. DZ'ye ait FTIR spektrumu incelendiğinde DZ'ye ait fonksiyonel gruplara ait gerilme ve eğilme titreşimleri görülmüştür.¹⁸⁰⁻¹⁸⁴ Boş ve DZ içeren tüm formülasyonlara ait FTIR spektrumları incelendiğinde ise boş ve DZ içeren formülasyonların spektrumlarının benzer olduğu görülmüştür. DZ içeren formülasyonların FTIR spektrumlarında DZ'ye ait karakteristik

pikler görülememiştir. Dolayısıyla, DZ'nin formülasyonlarda moleküler düzeyde dağıldığı anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, literatür sonuçları ile de uyumludur.^{266, 267}

Dordevic ve ark.²⁶⁶ saf diazepamın ve hazırladıkları boş ve diazepam içeren nanoemülsiyon formülasyonlarının FTIR spektrumlarını almışlardır. Saf etkin madde FTIR spektumunun diazepamı ait karakteristik pikleri gösterdiğini ancak, boş ve diazepam içeren nanoemülsiyon formülasyonlarına ait spektrumların aynı piklere sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Diazepam içeren nanoemülsiyon formülasyonlarına ait spektrumda diazepamı ait piklerin görülmediği, çünkü diazepamın formülasyonda moleküler seviyede dağıldığı ve etkin madde ile diğer formülasyon bileşenleri arasında herhangi bir kimyasal etkileşimin olmadığı belirtilmiştir.

B-NE, DZ-NE, B-NEJ ve DZ-NEJ formülasyonlarının TEM görüntüleri alınmış ve yağ damlacıklarının yaklaşık küresel ve nano-boyutlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.34- Şekil 4.37).

FDA tarafından farklı etkin maddelerin farklı dozaj şekilleri için çözünme/salın ortamları ve çalışma koşulları listeler halinde verilmiştir. Bunlar incelendiğinde, salın ortamı olarak genellikle tamponların (fosfat tamponu, asetat tamponu vb.) yüzey aktif madde içeren (Tween 80, SDS vb.) tamponların kullanıldığı görülmektedir.²⁶⁹

Çalışmamızda, salın çalışması hazırlanan tüm formülasyonlar için gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, hem damlacık boyutunun hem de viskozitenin etkin madde salını üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çözünme/salın çalışmaları için farklı ortamlar [amaca uygun olarak fizyolojik pH aralığında 1.2-7.5: seyreltik hidroklorik asit, tamponlar (fosfat veya asetat); yapay mide veya bağırsak sıvısı (enzim içeren veya içermeyen) ve su] kullanılmaktadır. Az çözünür etkin maddelerin çözünürlüğünü artırmak üzere belli bir yüzde oranında yüzey aktif madde (örn: SDS, polisorbattlar, laurildimetilamin oksit) içeren sulu çözeltiler (asidik çözeltiler veya tampon çözeltileri)

kullanılmaktadır.^{198, 269} Uygun bir yüzey aktif madde belirlendikten sonra “sink koşulu” sağlamak için gereken en düşük konsantrasyonu saptamak üzere bu yüzey aktif maddenin farklı konsantrasyonları araştırılmalıdır. Tipik olarak, sürfaktan konsantrasyonu, kritik misel konsantrasyonunun (CMC) üzerindedir.¹⁹⁸ İn vitro çözünme/salım çalışması için yöntem geliştirilirken, “sink koşul”un (çözünme/salım ortamı hacminin, etkin maddenin doymuş çözeltisini elde etmek için gerekli olan ortam hacminin en az üç katı olması koşulu) sağlanması gerekmektedir.^{198, 270, 271} Sink koşulunda, çözünme/salım sonuçlarının dozaj şeklinin özelliklerini yansıtması daha muhtemeldir. Çözünme/salım ortamının uygun bileşimi ve hacmi çözünürlük araştırmaları ile belirlenmektedir.¹⁹⁸

Ayrıca, “Sink” koşulu, bir etkin maddenin çözünme/salım ortamındaki doygunluk konsantrasyonunun, ortamdaki konsantrasyonunun en az üç katı olması durumudur şeklinde de tanımlayabiliriz.^{270, 271}

Uygun salım ortamının belirlenmesi amacıyla literatür taraması yapılmıştır. Oliveira ve ark.⁹⁶ tarafından % 11.1 oranında genistein ve % 27.8 oranında daidzein içeren 150 mg kuru soya ekstresi içeren tabletler hazırlanmış ve bu tabletlerin *in vitro* çözünme testi için ortam olarak %3 SDS içeren su kullanılmıştır. Test sırasında “Sink” koşulun sağlanması amacıyla öncelikle, % 3 SDS içeren suda genistein ve daidzein için çözünürlük çalışması gerçekleştirilmiş ve çözünürlükleri sırasıyla 825 µg/mL ve 250 µg/mL olarak saptanmıştır. Daha sonra, çözünme ortamı hacmi, daidzein ve genisteinin en yüksek miktarlarını çözecek teorik hacmin sırasıyla 5.4 ve 45 katı olacak şekilde seçilmiş ve çözünme testi USP Aparat 2 (pedal) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

DZ için hazırlanan farklı ilaç şekillerinden etkin madde salımını incelemek üzere salım ortamı olarak fosfat tamponu (PB; pH 6.8 ve 7.4) ve fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi (PBS; pH 6.8 ve 7.4) de sıklıkla kullanılmıştır.^{89, 95, 116, 272}

Sonuç olarak, tez çalışmamızda salım çalışmasının gerçekleştirileceği ortam olarak %5 SDS içeren PBS pH 7.4 seçilmiştir. DZ'nin bu ortamdaki çözünürlüğü belirlenmiş zaman aralıklarında (1., 3., 5.,8.,10.,12. saatlerde) saptanmıştır (Tablo 4.11). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde etkin madde çözünürlüğünün 179.922 ± 2.355 - 182.707 ± 0.545 aralığında değiştiği, ancak, tüm zaman noktaları için elde edilen çözünürlük değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p \geq 0.05$) bulunmuştur. DZ'nin salım ortamındaki çözünürlüğü 12. saatte 182.707 ± 0.545 olarak tespit edilmiştir. Buna göre, DZ'nin salım ortamındaki doygunluk konsantrasyonunun, salım ortamındaki teorik DZ konsantrasyonunun yaklaşık 3 katı (2.7) olduğu saptanmış ve salım çalışması için “Sink” koşulun sağlanacağı sonucuna varılmıştır.

İn vitro salım çalışması süresince DZ'nin %5 SDS içeren PBS pH 7.4'deki stabilitesi de incelenmiştir (Tablo 4.10). Bu çalışma sonucunda belirlenen zaman aralıklarında belirlenen etkin madde konsantrasyonları karşılaştırıldığında anlamlı bir değişimin olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$). Dolayısıyla, salım süresince etkin madde salım ortamında stabil kalmıştır.

Tez kapsamında, *in vitro* salım çalışması gerçekleştirilmiş ve DZ-NE, DZ-KE ve DZ-NEJ formülasyonlarından 12 saatte birim alandan salımı gerçekleşen DZ miktarları yaklaşık olarak $33 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ve $16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ olarak saptanmış ve salım miktarları açısından istatistiksel karşılaştırmada formülasyonlar arası farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Formülasyonlar arasında en küçük damlacık boyuna sahip DZ-NE formülasyonunda damlacık yüzey alanı artışına bağlı olarak etkin madde salımı DZ-KE ile karşılaştırıldığında artmıştır ($p < 0.05$). Ancak, DZ-NEJ formülasyonunda ise DZ-KE formülasyonuna göre daha küçük damlacık boyutuna sahip olmasına rağmen formülasyonun viskozitesindeki artışa bağlı olarak etkin madde salımı azalmış ($p < 0.05$) ve daha yavaş bir salım profili elde edilmiştir.

Piroksikam içeren nanoemülsiyon (oleik asit, Tween 80, etanol, etkin madde) formülasyonunun hazırlandığı bir çalışmada, nanoemülsiyonun viskozitesi topikal uygulama için düşük olduğundan (9.5-38.0 cP) jelleştirme ajanı olarak Karbopol 934 kullanılarak nanoemülsiyon bazlı jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel formülasyonlarının viskozitesi oluşan daha yoğun ağ yapısından dolayı önemli ölçüde artmıştır (>13712 cP). Permeasyon çalışması Franz difüzyon hücresinde sıçan derisi ve ortam olarak fosfat tamponu pH 7.4 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Küçük damlacık büyüklüğüne sahip nanoemülsiyonların permeasyon potansiyelinin yüksek olduğu, damlacık büyüklüğü düştükçe “stratum korneum”un sabit alanı ile etkileşebilecek damlacık sayısının artacağı belirtilmiştir. Nanoemülsiyon bazlı jelden etkin madde çıkışının yüksek viskoziteden dolayı nanoemülsiyona göre daha düşük olduğu ve bunun da yüksek viskozitesinden kaynaklanabileceği ifade edilmiştir. Bundan dolayı, jel formülasyonunun uzatılmış etki ve artmış viskozite nedeniyle cilt üzerine uygulanabilirliği bakımından nanoemülsiyona göre tercih edildiği raporlanmıştır.¹⁹¹

Aparna ve ark.²⁷³ suda çözünürlüğü düşük olan telmisartan için NE ve jelleştirme ajanı olarak Karbopol 934 kullanımıyla NEJ formülasyonlarını geliştirmişlerdir. NE formülasyonunun viskozitesinin düşük (yaklaşık 3 cP) olduğu, NEJ formülasyonunun viskozitesinin ise anlamlı bir şekilde arttığı ve psödoplastik akış tipine uyduğu saptanmıştır. Yapılan permeasyon çalışmalarında, NE formülasyonu ile karşılaştırıldığında NEJ formülasyonlarından etkin madde salımının uzun süreli olarak gerçekleştiği ifade edilmiştir. Ayrıca, NE formülasyonundan daha hızlı bir etkin madde salımının gerçekleşme nedeni olarak ise formülasyonun küçük damlacık boyutu gösterilmiştir.

Thomas ve ark.²⁴³ %2 kitosan kullanarak hazırladıkları kurkumin içeren nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonu için permeasyon çalışmasını sıçan derisi

kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Sonuç olarak, nanoemülsiyonların küçük damlacık boyutunun deriden permeasyon açısından jel formülasyonuna göre anlamlı bir artış sağladığı ifade edilmiştir. NEJ içinse kitosanın deri üzerine yayılabilirlik açısından formülasyonunu viskoziteni uygun hale getirdiği ve kurkuminin deri yüzeyinde kalış süresini artırdığı ifade edilmiştir. Ayrıca, NE formülasyonu ile karşılaştırıldığında NEJ formülasyonu için etkin maddenin deriden permeasyonunun daha yavaş gerçekleştiği ve bunun viskozite artışından kaynaklandığı bildirilmiştir.

Formülasyonlar için salım profillerinin Higuchi veya sıfırıncı derece salım kinetiğine uyup uymadığı incelenmiştir (Tablo 4.11). Sonuç olarak, incelenen formülasyonların sıfırıncı derece kinetiğe uygun salım sağladığı saptanmıştır. Sıfırıncı derece kinetikte, her bir zaman aralığında formülasyondan çözülmeye geçen etkin madde miktarı sabittir. Değiştirilmiş salım sistemlerinin hazırlanmasında öncelikle sıfırıncı derece salım kinetiğinin sağlanması hedeflenmektedir.^{191, 274, 275}

Barakat ve ark.²⁷⁶ transdermal uygulama için hazırladıkları indometazin içeren nanoemülsiyon formülasyonu için *in vitro* salım çalışmalarını selüloz membranı kullanarak 12 mL %20 alkol içeren 0.02 M fosfat tamponu (pH 7.4) (reseptör kompartmanı) içerisinde gerçekleştirmişlerdir. Nanoemülsiyonlardan indometazin salımının 0. derece kinetikle gerçekleştiği (doğrusal ilişkinin sink koşul sağlandığı sürece devam ettiği) raporlanmıştır.

Silva ve ark.¹⁷¹ bir izoflavon olan genistein için yumurta lesitini, orta zincirli tigliseritleri ve oktildodekanolü kullanarak topikal bir nanoemülsiyon formülasyonu geliştirmişlerdir. Emülsifikasyon öncesi yağ fazına genistein ilavesinin nanoemülsiyon özelliklerini değiştirmedeği ve lesitinin genisteinin formülasyona dahil edilmesinde önemli bir rol oynadığı vurgulanmıştır. Elde ettikleri 230-280 nm damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyonlar için Franz difüzyon hücrelerini ve domuz kulak derisi

kullanılarak permeasyon çalışmalarını gerçekleştirmişler ve yavaş bir permeasyon gerçekleştiğini saptamışlardır. Benzer sonuçlar, de Vargas ve ark.¹¹⁹ tarafından da raporlanmıştır. Genistein içeren nanoemülsiyonları içeren topikal hidrojellerin hazırlandığı diğer bir çalışmada, negatif zeta potansiyele, düşük viskoziteye ve <250 nm damlacık boyutuna sahip nanoemülsiyon viskozitesinin topikal uygulama için uygun hale getirilmesi amacıyla akrilik asit hidrojellerine ilave edilmiştir. Hidrojel formülasyonlarının psödoplastik akış tipine uyduğu ve domuz kulak derisi kullanılarak, Franz difüzyon hücrelerinde gerçekleştirilen permeasyon deneyi sonucunda yavaş bir etkin madde permeasyonunun sağlandığı raporlanmıştır.¹¹⁹

Nanoemülsiyonlar kinetik olarak kararlı sistemlerdir. Nanoemülsiyonların stabilitesi, genellikle 4 °C, 25 °C ve/veya 40 °C gibi farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmekte ve zamana bağlı olarak damlacık boyutu, damlacık boyutu dağılımı, zeta potansiyel ve etkin madde konsantrasyonu değerlendirilmektedir.^{277, 278} Emülsiyon sistemlerinde damlacık boyutu ile birlikte damlacık boyutu dağılımının da stabilite açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Damlacık boyutu flokülasyon ve koalesens ile doğrudan ilişkili olduğundan damlacık boyutu ve zeta potansiyel stabilitenin değerlendirilmesinde ölçülmesi gereken önemli parametrelerdir.²⁵⁴ Klasik emülsiyonlar, kısa raf ömrüne sahip ve nanoemülsiyonlara kıyasla daha az stabil ilaç şekilleridir. Saklanması sırasında kremalaşma, flokülasyon, koalesens ve faz ayrımı gibi yaygın stabilite problemleri ile karşı karşıyadır. Kremalaşma, flokülasyon, koalesens gibi stabilite sorunları nanoemülsiyonlarda nadiren görülür. Ancak, özellikle, “Oswald Ripening” etkisi nanoemülsiyonların stabilitesi açısından önemlidir.²⁷⁹ “Ostwald Ripening” etkisiyle oluşan damlacık büyümesine sebep olan en büyük etmen ise polidispersite indeksidir (PDI). Büyük damlacıklar ile küçük damlacıkların birarada

bulunması sonucu damlacıkların boyutu, çözünme ve kütle transferi nedeniyle artmaktadır.^{22, 254}

Dispers sistemlerde stabilitenin değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir parametre ise, damlacıklar/partiküller arasındaki etkileşimin ölçüsü olan zeta potansiyeldir. Elektrostatik olarak stabilitesi sağlanmış emülsiyon bazlı sistemlerde, yüksek bir zeta potansiyel değeri, flokülasyonun engellendiği daha stabil bir sistemi işaret etmektedir. Sterik olarak stabilitesi sağlanmış sistemlerde ise zeta potansiyelin yaklaşık 20 mV olması ile stabilitenin sağlanabileceği gösterilmiştir.^{280, 281}

Emülsiyonların pH değerlerinin izlenmesi, stabilite değerlendirmesinde formülasyonunu kalitesini etkileyen herhangi bir kimyasal reaksiyon (hidroliz, oksidasyon vb) olup olmadığını göstermesi açısından önemlidir.²⁸²

Bu çalışma kapsamında, 4 °C ve 25 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta stabilite değerlendirilmiştir. B-NE ve DZ-NE formülasyonları için 4 °C'de 90 gün boyunca damlacık boyutlarında (DB^b) anlamlı bir değişiklik meydana gelmeden ($p \geq 0.05$) saklanabildiği, ancak, 25 °C'de 90. günde B-NE ve DZ-NE formülasyonlarının damlacık boyutlarında (DB^b) bir artışın olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$; Tablo 4.12). 4 °C ve 25 °C'de, aynı zaman noktaları için damlacık boyutları karşılaştırıldığında ise aralarında 90. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p \geq 0.05$; 90. gün içinse $p < 0.05$ 'dir).

Nanoemülsiyon formülasyonlarının (B-NE ve DZ-NE), 4 °C ve 25 °C'de zeta potansiyelleri ölçülmüş (Tablo 4.15) ve her iki koşulda da zeta potansiyel değerlerinde (yaklaşık -20 mV civarında) önemli bir değişimin meydana gelmediği saptanmıştır ($p > 0.05$). 4 °C ve 25 °C'deki aynı zaman noktaları için viskozite değerleri (1500 sn^{-1} için elde edilen değerler açısından; Tablo 4.17) karşılaştırıldığında da anlamlı bir yükseliş veya düşüşün olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

DZ-NE ve B-NE formülasyonlarının pH değerlerindeki zamana bağlı değişim incelendiğinde (Tablo 4.16), 90 gün boyunca nanoemülsiyon formülasyonlarının pH değerlerindeki değişimlerin istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir ($p \geq 0.05$).

Polidispersite indekslerinde ise her iki sıcaklıkta da zamanla bir artış olduğu görülmüş ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0.05$; 25°C 'de 60.günde elde edilen değer hariç). Genel olarak, B-NE ve D-NE formülasyonlarının polidispersite indeksi değerleri < 0.4 olarak (25°C 'de 60.günde elde edilen değer hariç) saptanmıştır.

Ribeiro ve ark.²⁵⁴, geliştirdikleri nanoemülsiyon formülasyonları için 3 farklı sıcaklıkta (4°C , 25°C ve 45°C) 60 gün boyunca stabilite çalışmasını gerçekleştirmişler, damlacık boyutu, PDI, zeta potansiyel ve pH değerlerindeki değişimleri incelemişlerdir. Bu süre boyunca, 4°C 'de saklanan nanoemülsiyon formülasyonu damlacık boyutunu korurken, 25°C ve 45°C 'de saklanan örneğin damlacık boyutunda ise 60 günün sonunda anlamlı bir artış meydana gelmiştir. Damlacık boyutundaki değişime rağmen formülasyonun damlacık boyutu nano-boyutta kalarak nanoemülsiyon özelliğini korumuş ve makroskobik olarak herhangi bir değişim meydana gelmemiştir.

Bernardi ve ark.²⁸² hazırladıkları nanoemülsiyon formülasyonu için stabilite çalışmasını 5°C , 25°C ve 40°C 'de gerçekleştirmiş ve 90 gün boyunca damlacık boyutu ve pH değerleri saptanmıştır. Buna göre, 90 gün boyunca tüm sıcaklıklarda damlacık boyutu açısından anlamlı bir değişimin gözlenmediği, pH değerinin ise sadece 40°C 'de 90. günde anlamlı bir şekilde düştüğü, diğer koşullarda ise anlamlı bir değişim göstermediği ve dolayısıyla stabil bir nanoemülsiyon formülasyonu hazırlandığı ifade edilmiştir. 5°C ve 25°C 'deki sıcaklıklarda, 90 günlük stabilite çalışması boyunca hazırladıkları nanoemülsiyonun polidispersite indeksinin 0.2'nin altında kaldığı (düşük polidispersiteye sahip) ve stabilitesini koruduğu belirtilmiştir. Ayrıca, 1.0'a yakın

polidispersite değerlerinin ise sistemin polidispers bir sistem olduğunu göstereceği bilgisi de verilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise, silimarin içeren nanoemülsiyon formülasyonu için stabilite alışması 5°C ve 25°C’de 90 gün boyunca gerçekleştirilmiştir. Nanoemülsiyonun damlacık boyutu ve viskozitesi takip edilmiştir. Damlacık boyutu ve viskozite değerlerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmediği ve silimarinin oral olarak uygulanması için uygun, stabil bir emülsiyon hazırlandığı raporlanmıştır.²⁸³

Secvikova ve ark.²⁸⁴ HLB ve yağ:su oranının nanoemülsiyon stabilitesine etkisini inceledikleri çalışmalarında, hazırladıkları formülasyonları 4 °C, 25 °C ve 35 °C’de tutarak nanoemülsiyonlarda meydana gelen ayrışmayı değerlendirmişlerdir. Sıcaklık artışına bağlı olarak ayrışmanın hızlandığı, 4 °C’de saklanan nanoemülsiyonun ise 43 gün boyunca stabil kaldığı raporlanmıştır.

Sulaiman ve ark.²⁸⁵ tarafından, “*Clinacanthus nutans*” yaprak ekstresini içeren nanoemülsiyon formülasyonları hazırlanmış ve formülasyonun viskozitesi ksantan zankı kullanılarak artırılmıştır. 25 °C’de, 90 gün boyunca yapılan stabilite çalışması sonucunda nanoemülsiyon damlacık boyutunun “Oswalt ripening” etkisi sonucu arttığı ancak hala nano-boyut aralığında olduğu, ayrıca, zeta potansiyel değerinin de artış gösterdiği, sonuç olarak stabil bir nanoemülsiyon formülasyonu hazırlandığı bildirilmiştir.

Liang ve ark.²⁸⁶ tarafından hazırlanan (nane esansı ile orta zincirli triaçilgliserol karışımı kullanılmış) nanoemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutunun 25 °C’de 30 gün boyunca saklandığında arttığı ancak, kremalaşma veya faz ayrımının meydana gelmediği bildirilmiştir. Viskozite değişimi incelendiğinde ise viskozite değerlerinde düşüş meydana geldiği ancak formülasyonların psödoplastik akış özelliklerini koruduğu raporlanmıştır.

B-NEJ ve DZ-NEJ formülasyonları için 4 °C ve 25 °C’de gerçekleştirdiğimiz stabilite çalışmasında ise damlacık boyutlarında (DB^b) artış olduğu ve istatistiksel olarak bu artışın anlamlı olduğu ($p < 0.05$; her iki formülasyon için de 30. günde, DZ-NEJ formülasyonu için ise 90. günde ölçülen damlacık boyutları hariç; Tablo 4.13) görülmüştür. Ancak, damlacık boyutlarının hala nano-boyut aralığında (yaklaşık 191-365 nm) olduğu saptanmıştır. Bu iki formülasyonun, aynı zaman noktaları için 4 °C ve 25 °C’deki damlacık boyutları karşılaştırıldığında, sıcaklık artışının damlacık boyutu değişiminde etkili olmadığı görülmüştür. B-NEJ ve DZ-NEJ formülasyonlarının polidispersite indekslerindeki değişim incelendiğinde ise her iki saklama sıcaklığında da bu değerlerde anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.05$; Tablo 4.13). Her iki formülasyonun polidispersite indeks değerlerinin ≤ 0.5 olduğu saptanmıştır. B-NEJ ve D-NEJ formülasyonlarının 4 °C ve 25 °C’de zeta potansiyel değerlerinin 7. Gün itibariyle anlamlı bir şekilde değişerek arttığı ($p < 0.05$) ve formülasyonların her iki sıcaklık koşulunda da zeta potansiyel değerlerinin 90 gün boyunca yaklaşık 20-40 mV aralığında değiştiği saptanmıştır (Tablo 4.15). Stabilite çalışmasında, B-NEJ ve DZ-NEJ formülasyonlarının pH değerlerindeki zamana bağlı değişim her iki sıcaklık koşulunda incelendiğinde ise 90 gün boyunca meydana gelen değişimlerin istatistiksel olarak anlamsız olduğu tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonlarının viskoziteleri, 4 °C ve 25 °C’de formülasyonların viskozite değerleri (en uygun tork değerinin sağlandığı 112.5 sn^{-1} kayma hızında değerlendirildiğinde) arasında zamanla anlamlı bir değişim olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$; Tablo 4.17).

Nanoemülsiyon bazlı jeller için önemli kısıtlardan biri nanoemülsiyon fazının “Oswalt Ripening” etkisi nedeniyle stabilite kaybına uğrayabilmesidir. Çoğu durumda, nanoemülsiyonların kullanımdan kısa bir süre önce hazırlanması gerekebilir. Jel fazının stabilitesi ise önemli olan diğer bir konudur. Jelleştirme ajanlarının çoğu pH ve

sıcaklığa karşı oldukça hassastır. Sıcaklık ve pH değişimleri jel yapısının kaybına yol açabilir. Nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonları için uygun stabilitenin sağlanması için yüzey aktif maddenin/yardımcı yüzey aktif maddenin ve jelleştirme ajanının doğru tip ve miktarlarda seçilmesi de çok önemlidir.²⁰⁶

Dhawan ve ark.¹⁹¹ hazırladıkları piroksikam içeren nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonları için stabilite çalışmasını 4 °C ve 25 °C’de 90 gün boyunca gerçekleştirmişler ve pH değerleri, etkin madde içeriği, faz ayrımı ve şeffaflık açısından formülasyonun stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Diğer bir çalışmada, jelleştirme ajanı olarak Carbapol kullanılarak hazırlanan nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonlarının stabilitesi 4 °C, 25 °C ve 40 °C’de 12 ay boyunca değerlendirilmiştir. Viskoziteyi artırmak amacıyla ilave edilen jelleştirme ajanının damlacık boyutu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu, hazırlanan formülasyonun zeta potansiyel değerleri, damlacık büyüklüğü ve büyüklük dağılımı açısından 12 ay boyunca anlamlı bir değişim göstermediği bildirilmiştir.²⁸⁷

Jelleştirme ajanı olarak %1 Carbopol 934 kullanılarak hazırlanan dutasterid içeren nanoemülsiyon bazlı jel için stabilite çalışması 3 ay boyunca 4 °C and 25 °C’de gerçekleştirilmiştir. Her iki sıcaklık koşulunda da damlacık boyutu ve viskozitenin hafif bir şekilde arttığı ancak istatistiksel olarak önemli bir farkın oluşmadığı bildirilmiştir. Bu nedenle, fiziksel olarak stabil bir formülasyon hazırlandığı ve ayrıca, 3 aylık süre boyunca formülasyon halinde dutasterid maddesinin degradasyonunun en yavaş halde gerçekleştiği ve bu durumda maddenin formülasyondaki kimyasal stabilitesinin bir göstergesi olduğu ifade edilmiştir.²⁸⁸

Klasik emülsiyonların (B-KE ve DZ-KE) her iki saklama sıcaklığında da D[4,3] damlacık büyüklüğünün zamanla ve sıcaklık artışı ile arttığı (B-KE için 4 °C’de 3. gün ve D-KE için 25 °C’de 7. gün ölçümü hariç) ve bu artışın anlamlı olduğu görülmüştür

($p < 0.05$; Tablo 4.14). Klasik emülsiyonların damlacık büyüklüğü dağılımını belirleyen span değerleri her iki saklama sıcaklığında incelenmiş ve span değerlerindeki değişimin de anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$; Tablo 4.14). B-KE ve DZ-KE formülasyonlarının zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde, her iki sıcaklık koşulunda zamanla zeta potansiyel değerlerinde düşüş olduğu (Tablo 4.15), 4°C’de her iki formülasyon içinde zeta potansiyel değerlerinde zamanla saptanan düşüşün istatistiksel olarak anlamsız olduğu ($p > 0.05$; B-KE için 7 günde saptanan düşüş hariç) bulunmuştur. 25 °C’de ise B-KE formülasyonu için 3. günde zeta potansiyelde görülen düşüş anlamsız ($p > 0.05$) bulunurken 7. gündeki düşüş anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$); DZ-KE formülasyonu içinse 3. ve 7. günlerde saptanan düşüşler anlamlıdır ($p < 0.05$). Bu formülasyonların viskoziteleri, 1500 sn⁻¹ kayma hızında (en uygun tork değerinin sağlandığı) değerlendirilmiş (Tablo 4.17) ve her iki saklama sıcaklığında saptanan viskozite değerleri arasındaki farkın (zamanla ve sıcaklık etkisiyle oluşan) istatistiksel olarak anlamsız olduğu saptanmıştır ($p = 0.05$). Faz ayrımı nedeniyle her iki sıcaklık koşulunda B-KE ve DZ-KE formülasyonlarının pH değerleri sadece 7 gün ölçülmüş (Tablo 4.16) ve pH değerlerinde anlamlı bir değişim olmadığı saptanmıştır ($p > 0.05$).

Vitamin E içeren klasik emülsiyon (ortalama damlacık boyutu: 1285 nm) ve nanoemülsiyon (ortalama damlacık boyutu: 277 nm) formülasyonlarının hazırlandığı bir çalışmada, emülsiyon ve nanoemülsiyon formülasyonları bir ay boyunca farklı sıcaklıklarda (5 °C, 25 °C ve 40 °C) tutularak stabiliteyi incelenmiştir. Bir emülsiyonun uzun süreli stabilitesinin (diğer bir deyişle, emülsiyonun raf ömrü boyunca stabil kalmasının) formülasyon geliştirilmesi aşamasındaki en önemli faktörlerden birisi olduğu, bu nedenle, saklama süresinin (30 gün) ve sıcaklığın (4, 25 ve 40 °C) klasik emülsiyon ve nanoemülsiyonun stabilitesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla sadece damlacık büyüklüğünün değerlendirildiği belirtilmiştir.²⁸⁹ Bir aylık süre sonunda

her üç sıcaklık koşulunda nanoemülsiyonun gözlenen ortalama damlacık büyüklüğünde belirgin bir artış olduğu (damlacık büyüklüğünün 277-307 nm aralığında değiştiği), damlacık boyutundaki bu artışın, flokülasyon, koalesens ve “Ostwald ripening” etkisi gibi mekanizmalarla ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Klasik emülsiyon damlacık büyüklükleri ise bir aylık süre sonunda 1253 nm (4 °C), 988 nm (25 °C) ve 537 nm (40 °C) olarak tespit edilmiştir. Damlacık büyüklüklerindeki bu küçülmenin çözünme mekanizması ve yağ moleküllerinin emülsiyon damlacıklarından yüzey aktif madde miselleri içerisine hareketinin bir sonucu olabileceği ifade edilmiştir. Sıcaklığın düşmesi ile çözünme hızının düştüğü ve misel içerisine hareketin ise daha uzun sürede gerçekleştiği belirtilmiştir.²⁸⁹

Emülsiyon sistemlerinde saklama koşullarına bağlı olarak görülebilen damlacık büyüklüğündeki küçülmenin emülsiyon damlacıklarından misellere doğru olan yağ molekülü hareketinin, damlacık büyüklüğünde görülebilen artışın ise “Ostwald Ripening” etkisinin veya koalesensin bir sonucu olarak ortaya çıktığı Ziani ve ark.²⁹⁰ tarafından ifade edilmiştir.

Hashtjin ve ark.²⁹¹ %1 portakal kabuğu yağı ve %2 Tween 80 içeren nanoemülsiyonları ultrasonikasyon tekniği ile hazırlamışlar ve 12 hafta boyunca 5 °C, 25 °C ve 45 °C sıcaklıklarda saklayarak bekletme zamanı ve sıcaklığın damlacık büyüklüğü, damlacık büyüklüğü dağılımı ve viskozite üzerine olan etkilerini incelemiştir. 25 °C’de bekletilen formülasyonun damlacık büyüklüğünde, 4. ve 8. haftalarda anlamlı bir düşüş olduğu görülmüş, 12 haftada ise değer tekrar artış gösterdiği ve 0. gün ile kıyaslandığında farkın anlamlı olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Benzer sonuç 5 °C’de saklanan formülasyon için de elde edilmiş, ancak 45 °C’de saklanan formülasyonun damlacık büyüklüğünün genel olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.²⁹¹ Sıcaklığın etkisi değerlendirildiğinde, 5 °C ve 25 °C’de saklanan

formülasyonların damlacık büyüklüklerinin, 45 °C’de saklanan formülasyona göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bekletme süresinin PDI değerlerine etkisi değerlendirildiğinde, 4. ve 8. haftalarda PDI değerinin azaldığı, 12. haftada ise tekrar artış gösterdiği görülmüştür. En küçük PDI değerleri ise 25 °C’de bekletilen nanoemülsiyon fomülasyonları için saptanmıştır. Formülasyonların zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde hem sıcaklık hem de bekletme süresinin değerleri anlamlı şekilde değiştirdiği yazarlar tarafından bildirilmiştir. Hazırlanan formülasyonların viskozitelerinin her üç sıcaklıkta da Newtonian akış özelliklerini devam ettirdikleri, 5 °C ve 25 °C’de saklanan formülasyonların fiziksel stabilitelerini korudukları ve farmasötik taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirlikleri bildirilmiştir.²⁹¹

Stabilite çalışmamız kapsamında, zamana ve sıcaklığa bağlı olarak etkin madde miktarında meydana gelen değişim qade saptanmıştır (Tablo 4.18). 4 °C’de, DZ-NE formülasyonunda kalan etkin madde yüzdesi 3., 7. ve 15. günlerde yaklaşık >%96 iken (günler arasındaki fark anlamsızdır; $p \geq 0.05$) DZ-NEJ formülasyonunda ise >%98’dir (günler arasındaki fark anlamsızdır; $p \geq 0.05$). 25 °C’de, DZ-NE formülasyonunda kalan etkin madde yüzdesi 3., 7. ve 15. günlerde yaklaşık >%90 iken (günler arasındaki fark anlamsızdır; $p = 0.05$) DZ-NEJ formülasyonunda ise >%92 (günler arasındaki fark anlamsızdır; $p = 0.05$). Her iki sıcaklık koşulunda bu iki formülasyonda mevcut olan etkin madde yüzdesi 30., 60 ve 90. günde ilk güne göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p < 0.05$) ve mevcut olan etkin madde yüzdesi 30. günde yaklaşık >%83 ve 60. günde ise >%63 olarak saptanmıştır. 4 °C’de DZ-NE ve DZ-NEJ formülasyonlarında mevcut olan etkin madde yüzdesi 90. günde sırasıyla %64.189±1.045 ve %65.902±0.434’e düşerken, 25 °C’de ise sırasıyla %59.733±0.515 ve %61.357±0.535’e düşmüştür. Sıcaklık artışı ile etkin madde yüzdesinde azalma olduğu görülmektedir ($p < 0.05$). DZ-NEJ formülasyonundaki etkin madde yüzdesi her iki sıcaklık koşulunda da DZ-NE

formülasyonuna göre biraz yüksek olmasına rağmen, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.05$). DZ-KE formülasyonunda kalan etkin madde yüzdesi sadece 7 gün izlenebilmiştir. Her iki sıcaklık koşulunda da DZ-KE formülasyonundaki etkin madde yüzdesinde ilk güne göre 3. ve 7. günlerde anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir ($p \geq 0.05$).

DZ'nin stabilitesi ile ilgili literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Rostagno ve ark.²⁹² tarafından soya fasulyesi ekstresindeki izoflavonların ve standart çözeltilerin kısa süreli stabiliteleri farklı sıcaklıklarda ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $40\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve ışık altında (%0 ve %100) 1-7 gün süreyle incelenmiştir. İzoflavonların (DZ, genistein, glisitein vb.) miktar tayini için HPLC kullanılmıştır. DZ ve glisitein konsantrasyonlarının ışık yokluğunda $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklama ile değişmediği ancak ışık varlığında önemli derecede azaldığı saptanmıştır. Sıcaklığın, izoflavonların stabilitesi açısından önemli olduğu, ekstrelerin ve standart çözeltilerin saklama süresini önemli derecede etkilediği, izoflavonların konsantrasyonlarında önemli bir değişim ($<5\%$) olmadan $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ekstre ve standart çözeltilerin 30 gün, $5-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ise 7 gün saklanabileceği raporlanmıştır. 10 ve $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de DZ miktarı ışık yokluğunda sırasıyla yaklaşık % 100 ve 99.8 iken ışık varlığında sırasıyla yaklaşık %99.9 ve %77 olarak saptanmıştır. İzoflavonların $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklarda ve ışıktan korunarak saklanmaları gerektiği belirtilmiştir. Bu koşullar altında ekstrelerin bir haftaya kadar önemli derecede degradasyona (izoflavonlar açısından) uğramadan saklanabileceği ifade edilmiştir.

Ungar ve ark.²⁹³ tarafından da DZ'nin ve genisteinin termal stabilitesi incelenmiştir. DZ'nin ve genisteinin iki farklı pH'ya (pH 7 ve 9) sahip çözeltileri hazırlanmış ve farklı sıcaklıklarda ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $120\text{ }^{\circ}\text{C}$) stabilitesi değerlendirilmiştir. İzoflavonlar için degradasyonun 1. derece kinetikle gerçekleştiği,

90°C’de daidzeinin pH 7 ve 9 ortamlarındaki çözeltileri için bulunan Ea (aktivasyon enerji) değerlerinin sırasıyla 21.69 kcal/mol ve 8.38 kcal/mol olduğu saptanmıştır. DZ’nin ve genisteinin yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında degradasyona uğradığı, alkali çözeltilerde DZ’nin genisteine (~%60 azalma) göre termal uygulamadan (120 °C, 20 dakika) daha az etkilendiği ve DZ’nin konsantrasyonunda %15 gibi küçük bir azalmanın gerçekleştiği görülmüştür. Ancak, DZ’nin nötral pH’da ise genisteine göre daha az stabil olduğu ve DZ içeriğinde %40’a varan bir azalmanın gerçekleştiği belirtilmiştir.

Bununla birlikte, Nemitz ve ark.¹⁶⁷,’nin yaptıkları bir çalışmada ise izoflavonlar bakımından (aglikon yapıdaki) zengin soya ekstresini içeren nanoemülsiyon ve nanoemülsiyon bazlı jel formülasyonları hazırlanmış ve izoflavonların (DZ, glisitein, genistein) stabilitesi değerlendirilmiştir. Hazırlanmış olan standart çözeltilerin stabilitesi (asidik, alkali ve nötral koşullarda, oksidasyon ve termal stres açısından) değerlendirilmiştir. 25 °C ve 60 °C’de 6 saatlik maruziyet sonrasında oksidatif, asidik ve nötral koşullarda izoflavonlarda önemli bir değişim olmadığı saptanmıştır. Farklı matrislerdeki ekstre stabilitesi ise 25 °C’de 48 saat süreyle incelenmiş, bu süre sonunda tüm matrislerdeki DZ, genistein ve glisitein miktarlarının değişmediği ve % 99.45 ile % 101.99 arasında kaldığı saptanmıştır.

Çalışmamızda formülasyonların stabilite çalışması genel olarak değerlendirildiğinde, 4 °C’de saklanan formülasyonların daha stabil olduğu görülmektedir.

Alzorqi ve ark.²⁹⁴, β-D-glukan içeren nanoemülsiyonlarda yaptıkları stabilite çalışmalarında, 4 °C ve 25 °C’de saklanan formülasyonların stabilitelerini 90 gün boyunca izlemişler, damlacık boyutu ve PDI değerlerindeki değişimin daha az olduğu,

aktif maddenin daha stabil kaldığı 4°C'nin formülasyonun saklanması açısından daha uygun olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Hazırladığımız NE ve NEJ formülasyonları, stabil bir formülasyon için gerekli zeta potansiyel değerlerini 90 gün boyunca sağlamışlardır. Ayrıca, bu süre boyunca damlacık büyüklüğü “nano” aralığında kalmıştır. Derinin pH'sı, bireyin yaşına ve vücut bölgesine bağlı olarak 4-6 aralığında değişmektedir. Deride iritasyon ve buna bağlı olarak enfeksiyon oluşmaması amacıyla formülasyon pH'sının bu aralıkta olması gerekmektedir.⁷¹ Hazırladığımız formülasyonların pH'sı stabilite çalışması boyunca bu aralıkta kalmıştır. Stabilite çalışması sonucunda, KE formülasyonlarına göre fiziksel olarak daha stabil ve etkin madde stabilitesinin uzun süreli olarak korunması açısından çok daha üstün olan NE ve NEJ formülasyonlarının bu çalışma kapsamında hazırlandığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, kolorimetrik bir yöntem olan MTT kullanılarak sitotoksosite testleri melanoma (SK MEL30-An1) ve dermal fibroblast (PCS-201-012, normal) hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür taramasında, SK MEL30 ve PCS-201-012 hücre hatlarında daidzein ile ilgili yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

Casagrande and Darbon²⁹⁵ insan melanoma hücrelerini (OCM-1) kullanarak bazı flavonoidlerin hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Hücre kültürü çalışmasında örnekler %0.1 oranında DMSO içeren ortamda hazırlanmıştır ve hücreler örneklerle 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Yapılan bu çalışmada, yapıdaki OH grubu pozisyonunun ve benzopiron halkasının antiproliferatif etki üzerinde önemli bir etki yaptığı bu nedenle IC₅₀ değeri 9-19 µM olan flavon, falvonol gibi çok aktif bileşikler (A halkasının 5. pozisyonunda OH taşıdıklarından dolayı) ve IC₅₀ değeri 60-100 µM olan DZ (A halkasının 5. pozisyonunda OH taşımadığından dolayı) gibi daha düşük aktiviteli bileşiklerin farklı

mekanizmalarla hücre büyümesini ve hücre döngüsünü etkilediğini göstermişlerdir. 100 ve 150 μM DZ'nin sırasıyla %20 ve %25 oranında hücre ölümüne neden olduğu, hücre döngüsünü G1'de durdurduğu ve siklin-bağımlı kinazlardan olan CDK2 aktivitesini %40-60 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir.

Chang ve Tsai²⁹⁶ DZ'nin B16 melanoma hücrelerindeki sitotoksik etkilerini incelemek üzere 0.1, 1, 10, 25, 50, 100, or 200 μM dozlarda çalışmışlar, 72 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile hücre canlılığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri deney sonuçlarına göre, 50 μM 'dan daha az konsantrasyonlarda DZ uygulandığında hücre canlılığının % 95'in üzerinde devam ettiği, daha düşük konsantrasyonlardaki DZ'ye kıyasla 50 μM DZ uygulandığında da hücre canlılığında belirgin bir değişimin olmadığı görülmüştür. Ayrıca, 100 ve 200 μM DZ konsantrasyonları ile çalışıldığında ise sırasıyla yaklaşık %20 ve %40 oranlarında bir hücre ölümünün gerçekleştiği saptanmıştır.

Bu çalışmalar doğrultusunda, hücre kültürü çalışmamız için uygulanacak DZ konsantrasyonları 90, 180 ve 270 μM olarak belirlenmiştir.

Melanoma hücreleri üzerindeki etkinliğin değerlendirilmesi amacıyla SK MEL 30 hücre dizisi, farklı konsantrasyonlardaki saf DZ çözeltilerine, hazırlanan etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlara 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Hücrelerin canlılığı MTT testi kullanılarak tespit edilmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Her iki süre içinde, kontrol grupları (K1 ve K2) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$, Şekil 4.41-Şekil 4.42). Aynı şekilde, etkin madde içermeyen formülasyonlar (boş formülasyonlar) ile kontrol grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). 24 saat inkübasyon sonrası (Şekil 4.41) elde edilen sonuçlar açısından bakıldığında, saf DZ çözeltileri ve tüm formülasyonların (tüm DZ konsantrasyonlarında) kontrol grubu ve boş

formülasyonlara göre sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Ancak, yapılan istatistiksel değerlendirmede 90 µM için tüm formülasyonlar kendi kontrolleri olan boş formülasyonları ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$), 180 µM içinse D-NE ve DZ-NEJ formülasyonları B-NE ve B-NEJ formülasyonlarına göre anlamlı bir etki gösterirken ($p<0.05$) D-KE formülasyonu ile B-KE formülasyonu arasında anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ($p>0.05$). 270 µM için bakıldığında ise tüm DZ içeren formülasyonlar boş formülasyonlarına göre anlamlı bir sitotoksik etki göstermiştir ($p<0.05$). Saf DZ çözeltileri ise 90 µM konsantrasyon hariç kontrol grubuna göre anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmuştur (180 ve 270 µM için $p<0.05$). Saf DZ ve etkin madde içeren formülasyonlar arasında sitotoksik etki açısından karşılaştırma yapıldığında ise sadece 270 µM DZ-NE formülasyonu ile 270 µM saf DZ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer konsantrasyonlardaki NE, DZ-NEJ ve KE formülasyonları ile saf DZ arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Her bir konsantrasyonda DZ-NE, DZ-NEJ ve DZ-KE formülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise DZ-NE formülasyonu için % hücre canlılık değerleri daha düşük tespit edilmesine rağmen formülasyonlar arasında anlamlı bir fark elde edilememiştir ($p>0.05$). Konsantrasyon artışının sitotoksik etki üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

48 saat inkübasyon sonrası ise (Şekil 4.42), DZ-NE formülasyonu ile B-NE formülasyonu arasında tüm konsantrasyonlarda karşılaştırma yapıldığında DZ-NE'nin tüm konsantrasyonlarda boş formülasyonuna göre anlamlı bir sitotoksik etki gösterdiği ($p<0.05$), DZ-NEJ ve DZ-KE formülasyonları içinse 90 µM'lık konsantrasyonları hariç kendi boş formülasyonlarına göre anlamlı bir sitotoksik etki oluşturdukları tespit edilmiştir ($p<0.05$). Saf DZ (tüm konsantrasyonlarda) ise kontrol grubuna göre 90 µM'lık konsantrasyon hariç istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmuştur

($p < 0.05$). Saf DZ ile DZ-NE grupları karşılaştırıldığında ise DZ-NE formülasyonunun 180 μM hariç diğer konsantrasyonlarda Saf DZ'ye göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$). DZ-NEJ ve DZ-KE formülasyonları ile saf DZ karşılaştırıldığında ise tüm konsantrasyonlar için gruplar arası farklılığın anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Saf DZ, DZ-NE, DZ-NEJ ve DZ-KE formülasyonları için konsantrasyon artışının sitotoksosite üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında ise 90 ile 180 μM 'lık konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), 180 ile 270 μM 'lık konsantrasyonlar arasında ise anlamlı bir fark olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Her bir konsantrasyonda DZ-NE, DZ-NEJ ve DZ-KE formülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ise DZ-NE formülasyonu için % hücre canlılık değerleri daha düşük olarak saptanmasına rağmen sadece 270 μM 'lık konsantrasyon için DZ-NE ile DZ-NEJ ve DZ-KE formülasyonları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Zamana bağlı etki değerlendirildiğinde ise, sadece 270 μM 'lık konsantrasyon açısından saf DZ'ye ve tüm etkin madde içeren formülasyonlara maruziyet süresinin uzamasıyla % hücre canlılık değerlerinde anlamlı bir düşüşün olduğu ($p < 0.05$), diğer konsantrasyonlarda görülen düşüşün ise istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p \geq 0.05$).

Genistein ve DZ'nin farklı tümör hücre hatlarında hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir.^{215, 297-299} Genistein ve DZ'nin iki farklı metastatik melanoma hücre hattında [fare melanoma hücreleri (K1735M2) ve insan melanoma hücreleri (WM451)] hücre büyümesi, hücre döngüsü ilerlemesi ve farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Genisteinin, her iki melanoma hücre hattında hücre büyümesini doza bağımlı (30 ve 60 μM) bir şekilde inhibe edebileceği bulunmuş ve genisteinin her iki hücre hattında hücre döngüsünü G (2)/M fazında durdurduğu saptanmıştır. 30 μM DZ sadece K1735M2 hücrelerinin büyümesini geciktirmiş ancak WM451 hücrelerinin

büyümesi üzerinde belirgin bir etki göstermemiştir. DZ, K1735M2 hücre hattında hücre döngüsünün S fazında hücre sayısını arttırırken, G (1) fazında ise hücre sayısını azaltmıştır. Genistein ve DZ'nin melanomanın bazı malign fenotiplerini farklı mekanizmalarla inhibe edebileceği ve melanoma kanseri tedavisi için potansiyel adaylar olabilecekleri ifade edilmiştir.¹²¹

Bir DZ metaboliti olan 7,3',4'-trihidroksiizoflavonun UVB ile indüklenen melanoma olmayan cilt kanserine karşı kimyasal koruyucu olarak etkili olduğu *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir.^{120, 300} Metabolitin, Cot ve MKK4'e doğrudan bağlanarak bunların aktivitesini inhibe ettiği, UVB ile indüklenen siklooksijenaz 2 (COX-2) 'nin ekspresyonunu belirgin bir şekilde baskıladığı ve böylece tümör çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. DZ'nin biyotransformasyonu sonucu potansiyel bir kimyasal koruyucu madde olarak cilt kanserinde kullanılabileceği raporlanmıştır.^{120, 300}

Vilela ve ark.²¹⁵ 451Lu ve A375 melanoma hücrelerinde biyofermantasyon yoluyla elde edilmiş (BFSE) ve edilmemiş (SE) soya fasülyesi ekstralarının etkilerini incelemişlerdir. BFSE, SE'ye göre çok yüksek oranda izoflavon (yaklaşık 50 kat DZ ve 42 kat genistein) içermektedir. Sitotoksisite çalışmasında MTT kullanılmış, A375 hücreleri için 0–2.2 mg/mL ve 451Lu hücreleri içinse 0–1.6 mg/mL ekstre konsantrasyonları ile çalışılmıştır. DMSO (taşıyıcı) uygulanmış hücrelerin % 100 yaşadığının kabul edildiği vurgulanmıştır. 24 saat inkübasyon süresi ve farklı ekstre konsantrasyonlarında gerçekleştirilen sitotoksisite testinde konsantrasyon artışına bağlı olarak her iki hücre hattında BFSE'nin etkili olduğu ve hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir. BFSE IC₅₀ değerlerinin 451Lu hücreleri için 0.8 mg/mL ve A375 hücreleri içinse 1.7 mg/mL olduğu, SE'nin ise bu konsantrasyonlarda etkili olmadığı raporlanmıştır. İleri çalışmalarda, çok agresif olan A375 melanoma hücreleri için BFSE konsantrasyonunun 1.5-1.9 mg/mL olarak seçildiği ifade edilmiştir. İleri hücre kültürü

çalışmaları ile BFSE uygulanması (1.5-1.9 mg/mL; 24 saat) sonrası A375 hücrelerinin canlılığındaki azalmanın apoptozun indüksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, BFSE uygulanmasının PARP bölünmesinin indüksiyonu, kaspaz -3, -7 ve -8'in aktivasyonu ve TRAIL ve onun reseptörü DR4'ün artmış ekspresyonu ile sonuçlandığını ortaya koymuştur. Aynı zamanda, BFSE'nin, IKK'nın fosforilasyonunu ve aktivasyonunu, inhibitör kappa B α (I κ B α) degradasyonunu, p65/NF- κ B'nin çekirdeğe translokasyonunu artırdığı, BFSE ile indüklenen A375 hücrelerinin apoptozu için NF- κ B yolağının uyarılmasının gerekli olduğu, soya fasulyesinin biyofermentasyonla eldesinin ekstrenin antikanser etkisinde önemli bir rol oynadığı raporlanmıştır.²¹⁵

Başka bir çalışmada, UVB uygulanmamış BJ-5ta hücreleri (insan deri fibroblast hücreleri) üzerinde daidzeinin DMSO içerisindeki farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerinin (10, 30, 60 μ M) etkisi incelenmiş ve hücre canlılığı üzerinde 10 ve 30 μ M konsantrasyonlarının etkili olmadığı, 60 μ M'ın ise anlamlı bir değişime neden olmadığı, ancak, 60 μ M DZ konsantrasyonunda COX-2 ve Gadd45 (DNA hasarının belirteci olan genlerdendir) mRNA seviyelerinde bir artış olduğu, daha düşük konsantrasyonlarda ise anlamlı bir değişimin olmadığı belirtilmiştir.³⁰¹

Diğer bir çalışmada, DZ'nin farklı konsantrasyonlarının (0, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μ mol/L) MDA-MB-231 hücreleri (meme karsinoma hücreleri) üzerindeki sitotoksik etkisi 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası MTT yöntemi ile saptanmıştır. 24 saat inkübasyonda konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre çoğalmasının inhibisyonunda anlamlı bir değişim olmadığı, 48 saat inkübasyonda ise konsantrasyon 50 μ mol/L'den 100 μ mol/L'ye çıkarıldığında anlamlı bir inhibisyon etkisi elde edildiği bildirilmiştir. 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen sonuçlardan DZ için IC₅₀ değeri 65 \pm 15 μ mol/L olarak saptanmıştır.³⁰²

DZ'nin meme kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin incelendiği bir çalışmada DZ örnekleri %1 DMSO içeren ortamda hazırlanarak hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. Genisteine (IC₅₀: 6.5-12.0 µg/mL) göre DZ (IC₅₀: 20-34 µg/mL) hücre büyümesinin inhibisyonunda daha zayıf bir etkiye sahip olduğu raporlanmıştır.³⁰³

Dermal fibroblast hücreleri (normal) üzerindeki sitotoksik etkinin incelenmesi amacıyla insan fibroblast (PCS-201-012) hücre dizisi, farklı konsantrasyonlardaki saf DZ çözeltilerine, hazırlanan etkin madde içeren ve içermeyen formülasyonlara 24 ve 48 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Hücre canlılığı MTT yöntemi kullanılarak saptanmıştır. Çalışmamız sonucunda, kullanılan tüm DZ konsantrasyonlarında ve zaman bağlı olarak (saf DZ, etkin madde içeren ve içermeyen tüm formülasyonlar açısından) hücreler üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki oluşmadığı (p≥0.05) saptanmıştır. DZ ve DZ'nin bir metaboliti olan 6,7,4'-trihidroksiizoflavonun normal insan dermal fibroblast hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, hücrelerin örneklerle (1, 10, 20, 40, 80 and 100 µM) 24 saat inkübasyonu sonrası % hücre canlılığı tespit edilmiş ve tüm konsantrasyonlarda DZ'nin ve metabolitinin hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermediği saptanmıştır.³⁰⁴

Başka bir çalışmada, yenidoğan insan deri fibroblast hücreleri ile farklı konsantrasyonlarda DZ (0.5 µg/mL, 5 µg/mL, 50 µg/mL ve 100 µg/mL) 24 veya 48 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve daha sonra MTT yöntemi ile % hücre canlılığı tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre hücre canlılığında anlamlı bir azalmanın meydana gelmediği ve düşük DZ konsantrasyonlarında >%90'ın üzerinde hücre canlılığının devam ettiği sadece 100 µg/mL konsantrasyonda DZ'nin nispeten düşük bir sitotoksik etkiye neden olduğu görülmüştür.³⁰⁵

Hücre kültürü çalışmamızın sonucu olarak, hazırlanan tüm formülasyonların melanoma hücre hattına karşı DZ'nin sitotoksik etkisini koruduğu, genel olarak ise

küçük damlacık büyüklüğü ve salım özelliklerinden dolayı DZ-NE formülasyonunun sitotoksik etki açısından diğer formülasyonlara göre biraz daha etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca, saf DZ'nin ve tüm formülasyonların normal dermal fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği de saptanmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada DZ içeren NE ve NEJ formülasyonları başarılı bir şekilde hazırlanarak *in vitro* karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.
- DZ miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve analitik yöntem validasyonu (geçerlilik testleri) yapılmıştır.
- Damlacık büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri, B-NE ve DZ-NE formülasyonları için sırasıyla 151.12 ± 2.70 ve 149.80 ± 3.52 nm ve -22.57 ± 0.78 ve -19.32 ± 1.06 mV; B-NEJ ve DZ-NEJ için 191.48 ± 5.26 ve 200.25 ± 11.09 ve 18.67 ± 0.59 ve 19.35 ± 0.66 mV; B-KE ve DZ-KE için 2.830 ± 0.011 ve 4.420 ± 0.017 μm ve -15.50 ± 0.75 ve -14.67 ± 0.43 mV olarak tespit edilmiştir.
- Hazırlanan formülasyonların cilt ile uyumlu pH değerlerine (pH 4.53-5.54) sahip olduğu saptanmıştır.
- Protasan™ UP G 213 varlığında B-NEJ ve DZ-NEJ için pozitif zeta potansiyel değerleri elde edilmiş ve NE formülasyonları ile karşılaştırıldığında önemli bir viskozite artışı sağlanmıştır.
- KE formülasyonlarına göre daha stabil olan NE ve NEJ formülasyonları hazırlanmış ve bu formülasyonlardan DZ salımı 0. derece kinetikle gerçekleşmiştir.
- Hazırlanan tüm formülasyonların melanoma hücre hattına karşı DZ'nin sitotoksik etkisini koruduğu saptanmıştır.
- Saf DZ'nin ve tüm formülasyonların normal fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.
- Bu çalışmanın devamı olarak genistein ve DZ'nin metabolitlerini birarada içeren NE ve NEJ formülasyonları hazırlanabilir.

- NEJ formülasyonlarının hazırlanması amacıyla farklı jelleştirme ajanları ve konsantrasyonları kullanılabilir.
- Hazırlanan NE ve NEJ formülasyonlarının cilt kanserine karşı etkinliğinin tayin edilmesi amacıyla hayvan çalışmaları planlanabilir.



KAYNAKLAR

1. Lovelyn C. Current State of Nanoemulsions in Drug Delivery. *J Biomater Nanobiotechnol*, 2011, 02: 626-639.
2. Shah P, Bhalodia P, Shelat P. Nanoemulsions: a pharmaceutical review. *Sys Rev Pharma*, 2010, 1: 24-32.
3. Shadid MS, Chowdeswari A. A review on nanoemulsion. *Scandinavian J Pharm Sci Res (SJPSR)*, 2014, 1(1): 6-9.
4. Abolmaali SS, Tamaddon AM, Farvadi FS, Daneshamuz S, Moghimi H. Pharmaceutical nanoemulsions and their potential topical and transdermal applications. *Iranian J Pharm Sci (IJPS)*, 2011, 7: 139-150.
5. Bouchemal K, Briancon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm*, 2004, 280: 241-251.
6. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci*, 2004, 108-109: 303-318.
7. Tirnaksiz F, Akkus S, Celebi N. Nanoemulsions as Drug Delivery Systems. In: Fanun, M (ed). *Colloids in Drug Delivery*, 1st ed. Boca Raton, CRC Press, 2010: 221-244.
8. Singh M, Jain S. Nanoemulsions for skin targeting: present status and future prospects. *Drug Deliv Lett*, 2011, 1: 159-170.
9. Bhatt P, Madhav S. A detailed review on nanoemulsion drug delivery system. *Int J Pharm Sci Res*, 2011, 2: 2482-2489.
10. Chouksey RK, Pandey HK, Maithil A, Jain AK. Nanoemulsion: A Review. *Inventi Journals: Harm Tech*, 2011, 2.

11. Tırnaksız F. Nanoemülsiyonlar. İçinde: Zırh-Gürsoy A (ed). *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Derneği Yayını, 2014: 101-110.
12. Nance E, Zhang C, Shih TY, Xu Q, Schuster BS, Hanes J. Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration. *ACS Nano*, 2014, 8: 10655-10664.
13. Saenz del Burgo L, Hernandez RM, Orive G, Pedraz JL. Nanotherapeutic approaches for brain cancer management. *Nanomedicine*, 2014, 10: 905-919.
14. Meyers JD, Doane T, Burda C, Basilion JP. Nanoparticles for imaging and treating brain cancer. *Nanomedicine*, 2013, 8: 123-143.
15. Setya S, Talegaonkar S, Razdan BK. Nanoemulsions: Formulation methods and stability aspects. *World J Pharm Pharm Sci (WJPPS)*, 2014, 3: 2214-2228.
16. Ayata RE. Alfa-Lipoik Asit İçeren Topikal Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Tasarımı Ve Değerlendirilmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kozmetoloji Programı. Yüksek Lisans, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2010.
17. Sarker A, Shimu IJ, H. TR, Raju AA. Nanoemulsion: An excellent mode for delivery of poorly soluble drug through different routes. *J Chem Pharm Res*, 2015, 7: 966-976.
18. Sangwan Y, Hooda T, Kumar H. Nanoemulsions: A Pharmaceutical Review. *International Journal of Pharma Professional's Research (IJPPS)*, 2014, 5: 1031-1038.
19. Çelebi N. Emülsiyonlar. İçinde: Acartürk F, Ağabeyoğlu İ, Çelebi N, Değim T, Değim Z, Doğanay T, Takka S, Tırnaksız F (editörler). *Modern Farmasötik Teknoloji*, Ankara, Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, 2009: 277-299.

20. Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and micro-emulsions: clarifications of the critical differences. *Pharm Res*, 2011, 28: 978-985.
21. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 2012, 8: 1719-1729.
22. Koroleva MY, Yurtov EV. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russ Chem Rev*, 2012, 81: 21-43.
23. Rajpoot P, Pathak K, Bali V. Therapeutic applications of nanoemulsion based drug delivery systems: a review of patents in last two decades. *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 2011, 5: 163-172.
24. Scholz P, Keck CM. Nanoemulsions produced by rotor-stator high speed stirring. *Int J Pharm*, 2015, 482: 110-117.
25. Hall S, Cooke M, El-Hamouz A, Kowalski AJ. Droplet break-up by in-line Silverson rotor-stator mixer. *Chem Eng Sci*, 2011, 66:2068-2079.
26. Meleson K, Graves S, Mason TG. Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear. *Soft Mater*, 2004, 2 (2-3): 109-123.
27. Jafari SM, He Y, Bhandari B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. *J Food Eng*, 2007, 82: 478-488.
28. Mangale MR, Pathak SS, Mene HR, More BA. Nanoemulsions: As pharmaceutical overview. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2015, 33(1): 244-252.
29. Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20: 338-344.
30. Kentish S, Wooster TJ, Ashokkumar M, Balachandran S, Mawson R, Simons L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innov Food Sci & Emerg Technol*, 2008, 9: 170-175.

31. Ghosh V, Saranya S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *J Nanosci Nanotechnol*, 2013, 13: 114-122.
32. Li PH, Chiang BH. Process optimization and stability of D-limonene-in water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. *Ultrason Sonochem*, 2012, 19: 192-197.
33. Leong TSH, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem*, 2009, 16: 721-727.
34. Wang Z, Neves MA, Isoda H, Nakajima M. Preparation and characterization of micro/nano-emulsions containing functional food components. *Jpn J Food Eng*, 2015, 16(4): 263-276.
35. Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, Chourasia MK. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, 2017, 252:28-49.
36. Liu W, Yang XL, Ho WSW. Preparation of uniform-sized multiple emulsions and micro/nano particulates for drug delivery by membrane emulsification. *J Pharm Sci*, 2011, 100(1): 75-93.
37. Vladislavljevic GT, Shimizu M, Nakashima T. Preparation of monodisperse multiple emulsions at high production rates by multi-stage premix membrane emulsification. *J Memb Sci*, 2004, 244: 97-106.
38. Nakashima T, Shimazu M, Kukizaki M. Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 45: 47-56.
39. Charcosset C, Limayem I, Fessi H. The membrane emulsification process- a review. *J Chem Technol Biotechnol*, 2004, 79: 209-218.

40. Joscelyne SM, Tragardh G. Membrane emulsification- a literature review. *J Memb Sci*, 2000, 169: 107-117.
41. Ribeiro HS, Rico LG, Badolato GG, Schubert H. Production of O/W emulsions containing astaxanthin by repeated premix membrane emulsification. *J Food Sci*, 2005, 70(2): 117-123.
42. Trentin A, De Lamo S, Güell C, Lopez F, Ferrando M. Protein stabilized emulsions containing beta-carotene produced by premix membrane emulsification. *J Food Eng*, 2011, 106: 267-274.
43. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nanoemulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2005, 10: 102-110.
44. Sokolov YV. Nanoemulsion formation by low-energy methods: a review. *News of Pharmacy*, 2014, 3(79): 16-19.
45. Fernandez P, Andre V, Rieger J, Kühnle A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2004, 251: 53-58.
46. Sonnevile-Aubrun O, Babayan D, Bordeaux D, Lindner P, Rata G, Cabane B. Phase transition pathways for the production of 100 nm oil-in-water emulsions. *Phys Chem Chem Phys*, 2009, 11: 101-110.
47. Gupta A, Eral HB, Hatton TA, Doyle PS. Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Mater*, 2016, 12: 2826- 2841.
48. Vitale SA, Katz JL. Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: the ouzo effect. *Langmuir*, 2003, 19: 4105-4110.
49. Ganachaud F, Katz JL. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. *ChemPhysChem*, 2005, 6: 209-216.

50. Zhang Y, Shang Z, Gao C, Du M, Xu S, Song H, Liu T. Nanoemulsion for solubilization, stabilization and in vitro release of pterostilbene for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*, 2014, DOI: 10.1208/s12249-014-0129-4.
51. Gong Y, Wu Y, Zheng C, Fan L, Xiong F, Zhu J. An excellent delivery system for improving the oral bioavailability of natural vitamin E in rats. *AAPS PharmSciTech*, 2012, 13(3): 961-966.
52. Fast JP, Mecozzi S. Nanoemulsions for intravenous drug delivery. In: Villiers MM, Aramwit P, Kwon GS (eds). *Nanotechnology in Drug Delivery*. 1st ed. New York, Springer, 2009: 461-489.
53. Najlah M, Kadam A, Wan KW, Ahmed W, Taylor KMG, Elhissi AMA. Novel paclitaxel formulations solubilized by parenteral nutrition nanoemulsions for application against glioma cell lines. *Int J Pharm*, 2016, 506: 102-109.
54. Ramreddy S, Kandadi P, Veerabrahma. Formulation and pharmacokinetics of diclofenac lipid nanoemulsions for parenteral application. *PDA J Pharm Sci and Tech*, 2012, 66: 28-37.
55. Urtti A. Challenges and obstacles of ocular pharmacokinetics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58: 1131-1135.
56. Daull P, Lallemand F, Garrigue JS. Benefits of cetalkonium chloride cationic oil-in-water nanoemulsions for topical ophthalmic drug delivery. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 66: 531-541.
57. Ammar HO, Salama HA, Ghorab M, Mahmoud AA. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. *AAPS PharmSciTech*, 2009, 10(3): 808-819.
58. Daull P, Lallemand F, Philips B, Lambert G, Buggage R, Garrigur JS. Distribution of cyclosporine A in ocular tissues after topical administration of

- cyclosporine A cationic emulsions to pigmented rabbits. *Cornea*, 2013, 32(3): 345-354.
59. Klang S, Abdulrazik M, Benita S. Influence of emulsion droplet surface charge on indomethacin ocular tissue distribution. *Pharm Dev Technol*, 2000, 5(4): 521-532.
60. Li X, Müller RH, Keck CM, Bou-Chacra NA. Mucoadhesive dexamethasone acetate-polymyxin B sulfate cationic ocular nanoemulsion- novel combinatorial formulation concept. *Pharmazie*, 2016, 71: 327-333.
61. Lallemand F, Daull P, Benita S, Buggage R, Garrigue JS. Successfully improving ocular drug delivery using the cationic nanoemulsion, Novasorb. *J Drug Deliv*, 2012, doi:10.1155/2012/604204.
62. Arora R, Aggarwal G, Harikumar SL, Kaur K. Nanoemulsion based hydrogel for enhanced transdermal delivery of ketoprofen. *Advances in Pharmaceutics*, 2014, doi:10.1155/2014/468456.
63. Kaur A, Katiyar SS, Kushwah V, Jain S. Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. *Nanomedicine*, 2017, 13: 1473-1482.
64. Campani V, Biondi M, Mayol L, Cilurzo F, Pitaro M, De Rosa G. Development of nanoemulsions for topical delivery of vitamin K1. *Int J Pharm*, 2016, 511: 170-177.
65. Miastkowska M, Sikora E, Ogonowski J, Zielina M, Ludzik A. The kinetic study of isotretinoin release from nanoemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*, 2016, 510: 63-68.
66. Shakeel F, Haq N, Al-Dhfyhan A, Alanazi FK, Alsarra AA. Chemoprevention of skin cancer using low HLB surfactant nanoemulsion of 5-fluorouracil: a preliminary study. *Drug Deliv*, 2015, 22(4): 573-580.

67. Tagne JB, Kakumanu S, Nicolosi RJ. Nanoemulsion preparation of the anticancer drug dacarbazine significantly increase its efficacy in a xenograft Mouse melanoma model. *Mol Pharm*, 2008, 5(6): 1055-1063.
68. Yukuyama MN, Ghisleni DDM, Pinto TJA, Bou-Chacra NA. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics-a review. *Int J Cosmet Sci*, 2016, 38(1): 13-24.
69. Li D, Wu Z, Martini N, Wen J. Advanced carrier systems in cosmetics and cosmeceuticals: a review. *J Cosmet Sci*, 2011, 62(6): 549-563.
70. Quintão FJO, Tavares RSN, Vieira-Filho SA, Souza GHB, Santos ODH. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. *Rev Bras Farm*, 2013, 23(1): 101-107.
71. Mahdi ES, Noor AM, Sakeena MH, Abdullah GZ, Abdulkarim MF, Sattar MA. Formulation and in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil-esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 2499-2512.
72. Silva FFF, Ricci-Junior E, Mansur CRE. Nanoemulsions containing octyl methoxycinnamate and solid particles of TiO₂: preparation, characterization and in vitro evaluation of the solar protection factor. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013, 39(9): 1378-1388.
73. Olvera-Martinez BI, Cazares-Delgadillo J, Calderilla-Fajardo SB, Villalobos-Garcia R, Ganem- Quintanar A, Quintanar-Guerrero D. Preparation of polymeric nanocapsules containing octyl methoxycinnamate by the emulsification-diffusion technique: penetration across the stratum corneum. *J Pharm Sci*, 2005, 94(7): 1552-1559.

74. Barreto SMA, Maia MS, Benica AM, de Assis HRBS, Leita-Silva VR, da Rocha-Filho PA, de Negreiros MMF, Rocha HAO, Ostrosky EA, Lopes PS, Sales VSF, Giordani RB, Ferrari M. Evaluation of in vitro and in vivo safety of the by-product of *Agave sisalana* as a new cosmetic raw material: development and clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing. *Ind Crops Prod*, 2017, 108:470-479.
75. Bucar F. Phytoestrogens in plants: with special reference to isoflavones. In: Preedy VR (editör). *Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, 1st ed. UK, The Royal Society of Chemistry, 2013: 14-27.
76. Villares A, Rostagno McA, Garcia-Lafuente A, Guillamon E, Martinez JA. Content and profile of isoflavones in soy-based foods as a function of the production process. *Food Bioprocess Tech*, 2009, 4: 27-38.
77. Arkan T. *Daphne Oleoides* subsp. *oleoides* ve *Daphne Sericea*'nın Farklı Çözücülerle Antioksidan Özellikleri. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Konya: Selçuk Üniversitesi, 2011.
78. Birman H. Bitkisel flavonoid bileşiklerinin biyoaktiviteleri ve muhtemel etki mekanizmaları - bioactivities of plant flavonoids and the possible action mechanisms. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 2013, 75: 46-49.
79. Zhang N, Zhang N, She DD, Hu LD, Liu HF. Preparation and Evaluation of Daidzein Loaded Self-Microemulsifying Drug Delivery System. *Applied Mechanics and Materials*, 2011, 140: 200-205.
80. Sweetman SC. (ed). *Martindale: The Complete Drug Reference*, 36th ed. London, The Pharmaceutical Press, 2009.
81. LC Laboratories. Product Name Index, Daidzein. <http://www.lclabs.com/products/38-d-2946-daidzein>. 24 Haziran 2017.

82. Sigma-Aldrich Co. Products, Daidzein.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d7802?lang=en®ion=TR>.
24 Haziran 2017.
83. Cayman Chemical Company. Research Products Overview, Daidzein.
<https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/10005166>. 24
Haziran 2017.
84. Huang ZR, Hung CF, Lin YK, Fang JY. In vitro and in vivo evaluation of topical delivery and potential dermal use of soy isoflavones genistein and daidzein. *Int J Pharm*, 2008, 364: 36-44.
85. Nan G, Shi J, Huang Y, Sun J, Lv J, Yang G, Li Y. Dissociation Constants and Solubilities of Daidzein and Genistein in Different Solvents. *J Chem Eng Data*, 2014, 59: 1304-1311.
86. McLeod GS, Shepherd MJ. Determination of the ionisation constant of isoflavones by capillary electrophoresis. *Phytochem. Anal*, 2000, 11: 322-326.
87. Tsujimoto M, Horie M, Honda H, Takara K, Nishiguchi K. The structure-activity correlation on the inhibitory effects of flavonoids on cytochrome P450 3A activity. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32: 671-676.
88. Kitagawa S, Inoue K, Teraoka R, Morita SY. Enhanced skin delivery of genistein and other two isoflavones by microemulsion and prevention against UV irradiation-induced erythema formation. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58: 398-401.
89. Shen Q, Li X, Yuan D, Jia W. Enhanced oral bioavailability of daidzein by self-microemulsifying drug delivery system. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58: 639-643.
90. Yang G-D, Huang Y-R, Nan G-J, Chen H-J, Zeng A-G, Bian X-L. Solubility of daidzein in the binary system of ethanol and water. *J Mol Liq*, 2013, 180: 160-163.

91. Zeng A-G, Pang X-L, Wu N, Wang D, Nan G-J, Yang G-D, Bian X-L. Solubility of daidzein in propylene glycol plus water cosolvent mixtures. *Fluid Phase Equilib*, 2014, 366: 127-133.
92. Zhao C, Wang Y, Su Y, Zhang H, Ding L, Yan X, Zhao D, Shao N, Ye X, Cheng Y. Inclusion complexes of isoflavones with two commercially available dendrimers: Solubility, stability, structures, release behaviors, cytotoxicity, and anti-oxidant activities. *Int J Pharm*, 2011, 421: 301-309.
93. Ma Y, Zhao X, Li J, Shen Q. The comparison of different daidzein-PLGA nanoparticles in increasing its oral bioavailability. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 559-570.
94. Minghetti P, Cilurzo F, Casiraghi A, Montanari L. Evaluation of ex vivo human skin permeation of genistein and daidzein. *Drug Deliv*, 2006, 13: 411-415.
95. Ge Y, Mei Z, Liu X. Evaluation of daidzein-loaded chitosan microspheres in vivo after intramuscular injection in rats. *Yakugaku Zasshi*, 2011, 131: 1807-1812.
96. Oliveira SRd, Taveira SF, Marreto RN, Valadares MC, Diniz DGA, Lima EM. Preparation and characterization of solid oral dosage forms containing soy isoflavones. *Rev Bras Farmacogn*, 2013, 23: 175-182.
97. Leonarduzzi G, Testa G, Sottero B, Gamba P, Poli G. Design and development of nanovehicle-based delivery systems for preventive or therapeutic supplementation with flavonoids. *Curr Med Chem*, 2010, 17: 74-95.
98. Waqas MK, Akhtar N, Mustafa R, Jamshaid M, Khan HM, Murtaza G. Dermatological and cosmeceutical benefits of Glycine max (soybean) and its active components. *Acta Pol Pharm*, 2015, 72: 3-11.

99. Yalçın T. Flavonoidlerin Kanser Hücrelerine Etkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı.Yüksek Lisans, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2013.
100. Baber RJ. Phytoestrogens in Health: The Role of Isoflavones. In: Preedy VR (ed). *Isoflavones: Chemistry, Analysis, Function and Effects*,1st ed. UK, The Royal Society of Chemistry, 2013: 3-13.
101. İnanç N, Tuna Ş. Fitoöstrojenler ve sağlıktaki etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 2005, 2: 91-95.
102. Ltd U-VH. Plant magic –flavonoids and isoflavones. <http://univite.com/LibraryCateq/Library/chapter%206%20Flavonoid-isoflav.pdf>. 24 Haziran 2017.
103. Büyüktuncer Z, Başaran AA. Fitoöstrojenler ve sağlıklı yaşamdaki önemleri. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2005, 25: 79-94.
104. Uifalean A, Schneider S, Ionescu C, Lalk M, Iuga CA. Soy Isoflavones and Breast Cancer Cell Lines: Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *Molecules*, 2015, 21: E13.
105. Öncel M. Isı şok proteinleri ve kanser. *Eur J Basic Med Sci*, 2012, 2: 16-23.
106. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*, 2013, 2013: 162750.
107. Kim J, Hwang JS, Cho YK, Han Y, Jeon YJ, Yang KH. Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001, 14: 11-19.
108. Caddeo C, Teskac K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *Int J Pharm*, 2008, 363: 183-191.

109. Vayalil PK, Elmets CA, Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. *Carcinogenesis*, 2003, 24: 927-936.
110. Fang JY, Hwang TL, Huang YL, Fang CL. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *Int J Pharm*, 2006, 310: 131-138.
111. Chen L, Ravis WR, Babu RJ. Formulation of genistein nanoemulsions for enhanced transdermal delivery, in vitro. <http://abstracts.aaps.org/Verify/aaps2013/postersubmissions/T2245.pdf>. 24 Haziran 2017.
112. Cho HY, Park CM, Kim MJ, Chinzorig R, Cho CW, Song YS. Comparative effect of genistein and daidzein on the expression of MCP-1, eNOS, and cell adhesion molecules in TNF-alpha-stimulated HUVECs. *Nutr Res Pract*, 2011, 5: 381-388.
113. Gao Y, Gu W, Chen L, Xu Z, Li Y. The role of daidzein-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles in therapy for cardio-cerebrovascular diseases. *Biomaterials*, 2008, 29: 4129-4136.
114. Borghetti GS, Pinto AP, Lula IS, Sinisterra RD, Teixeira HF, Bassani VL. Daidzein/cyclodextrin/hydrophilic polymer ternary systems. *Drug Dev Ind Pharm*, 2011, 37: 886-893.
115. Dwiecki K, Neunert G, Polewski P, Polewski K. Antioxidant activity of daidzein, a natural antioxidant, and its spectroscopic properties in organic solvents and phosphatidylcholine liposomes. *J Photochem Photobiol B*, 2009, 96: 242-248.

116. Zhang Z, Huang Y, Gao F, Bu H, Gu W, Li Y. Daidzein-phospholipid complex loaded lipid nanocarriers improved oral absorption: in vitro characteristics and in vivo behavior in rats. *Nanoscale*, 2011, 3: 1780-1787.
117. Adjakly M, Ngollo M, Boiteux JP, Bignon YJ, Guy L, Bernard-Gallon D. Genistein and daidzein: different molecular effects on prostate cancer. *Anticancer Res*, 2013, 33: 39-44.
118. He J, Wang S, Zhou M, Yu W, Zhang Y, He X. Phytoestrogens and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *World J Surg Oncol*, 2015, 13: 231.
119. de Vargas BA, Bidone J, LK, Koester LS, Bassani VL, Teixeira HF. Development of topical hydrogels containing genistein-loaded nanoemulsions. *J Biomed Nanotechnol*, 2012, 8: 330-336.
120. Lee DE, Lee KW, Byun S, Jung SK, Song N, Lim SH, Heo YS, Kim JE, Kang NJ, Kim BY, Bowden GT, Bode AM, Lee HJ, Dong Z. 7,3',4'-Trihydroxyisoflavone a metabolite of the soy isoflavone daidzein suppresses ultraviolet B-induced skin cancer by targeting Cot and MKK4. *J Biol Chem*, 2011, 286: 14246-14256.
121. Wang HZ, Zhang Y, Xie LP, Yu XY, Zhang RQ. Effects of genistein and daidzein on the cell growth, cell cycle, and differentiation of human and murine melanoma cells(1). *J Nutr Biochem*, 2002, 13: 421-426.
122. Ge YB, Chen DW, Xie LP, Zhang RQ. Optimized preparation of daidzein-loaded chitosan microspheres and in vivo evaluation after intramuscular injection in rats. *Int J Pharm*, 2007, 338: 142-151.

123. Lee P, Nasir A, Wang KYK. Emerging nanomedicine for skin cancer. In: Nasir A, Friedman A, Wang S (eds). *Nanotechnology in Dermatology*, 1st ed. New York, Springer, 2013: 119-125.
124. Schleve MJ. Sık Görülen Deri Maligniteleri. İçinde: Dermatoloji Sırları, Kazancı G (Çeviri editörü). *Dermatology Secrets in Color*, Fitzpatrick JE, Aeling JL. 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: 313-319.
125. World Health Organisation. Skin Cancer. <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>. 24 Haziran 2017.
126. Kaya TI. Deri Kanseri. http://www.mersinsaglik.gov.tr/HaberDownload%5C449_12_539_Deri%20Kanseri.pdf. 24 Haziran 2017.
127. Walsh P, Hoffman S. Malin Melanom. İçinde: Dermatoloji Sırları, Kazancı G (Çeviri editörü). *Dermatology Secrets in Color*, Fitzpatrick JE, Aeling JL. 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: 320-327.
128. Parlak A, Çayırılı M, Parlak N, Ekinci Ş. Melanoma genel bakış. *Konuralp Tıp Dergisi*, 2014, 6(1): 22-27.
129. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*, 2003, 139: 1620-1624.
130. Or AN, Kotoğyan A. Habis Tümörler. İçinde: Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH, Baransü O (editörler). *Dermatoloji*, 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 1994: 652-684.
131. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melenocyte to metastatic melanoma. *Dermatol Res Pract*, 2010, doi: 10.1155/2010/583748.
132. Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site for whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(5): 1241-1244.

133. Chevalier V, Barbe C, Le Clainche A, Arnoult G, Bernard P, Hibon E, Grange F. Comparison of anatomical locations of cutaneous melanoma in men and women: a population-based study in France. *Br J Dermatol*, 2014, 171: 595-601.
134. Erdei E, Torres SM. A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2010, 10(11): 1811-1823.
135. Newton-Bishop JA. The epidemiology, aetiology and prevention of melanoma. In: Rajpar S, Marsden J (eds). *ABC of Skin Cancer*, 1st ed. Oxford, Blackwell Publishing, 2008: 1-4.
136. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*, 2005, 41(1): 45-60.
137. Newton-Bishop JA, Chang YM, Elliott F, Chan M, Leake S, Karpavicius B, Haynes S, Fitzgibbon E, Kukulizch K, Randerson-Moor J, Elder DE, Bishop DT, Barrett JH. Relationship between sun exposure and melanoma risk for tumours in different body sites in a large case-control study in a temperate climate. *Eur J Cancer*, 2011, 47(5): 732-741.
138. Armstrong BK, Cust AE. Sun exposure and skin cancer, and the puzzle of cutaneous melanoma a perspective on Fears et al. mathematical models of age and ultraviolet effects on the incidence of skin cancer among whites in the United States *American Journal of Epidemiology* 1977; 105:420-427. *Cancer Epidemiol*, 2017, doi: 10.1016/j.canep.2017.04.004
139. Kanavy HE, Gerstenblith MR. Ultraviolet radiation and melanoma. *Semin Cutan Med Surg*, 2011, 30(4): 222-228.

140. Green AC, Williams GM, Logan V, Strutton GM. Reduced melanoma after regular sunscreen use: randomized trial follow-up. *J Clin Oncol*, 2011, 29(3): 257-263.
141. Chen ST, Geller AC, Tsao H. Update on the epidemiology of melanoma. *Curr Dermatol Rep*, 2013, 2(1): 24-34.
142. Akyol M, Berksoy Hayta S. Fotoimmunoloji. *Türkderm*, 2013, 47(1): 52-57.
143. Karaca Ş, Güder H. Dermatolojide antioksidan sistem. *Turk J Dermatol*, 2009, 3: 32-39.
144. Özdemir F. Malign melanom. *J Dermatol-Special Topics*, 2013, 6(3): 24-43.
145. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*, 2005, 41(1): 28-44.
146. Begg CB, Hummer A, Mujumdar U, Armstrong BK, Krickler A, Marrett LD, Millikan RC, Gruber SB, Anton-Culver H, Klotz JB, Zannetti R, Gallagher RP, Dwyer T, Rebbeck TR, Berwick M. Familial aggregation of melanoma risks in a large population-based sample of melanoma cases. *Cancer Causes and Control*, 2004, 15:957-965.
147. Garbe C, Büttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Kruger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, Tilgen W, Guggenmoos-Holzmann I, Orfanos CE. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol*, 1994, 102(5): 695-699.
148. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family

- history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*, 2005, 41(14): 2040-2059.
149. Yüce S, Öksüz M, Ersöz ME, Kahraman A, Işık D, Atik B. Investigation of skin cancer in the geriatric age group, Geriatrik yaş grubunda cilt kanseri olgularının İrdelenmesi, *Turk J Geriatr*, 2014, 17: 228-233.
150. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol*, 2006, 19: 71-87.
151. National Cancer Institute SEER Training Modules. <http://training.seer.cancer.gov>. 11 Temmuz 2017.
152. Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV, Kopf AW, Bart RS. Breslow thickness and Clark level in melanoma. *Cancer*, 2000, 88(3): 589-595.
153. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF. Update on the melanoma staging system: the importance of sentinel node staging and primary tumor mitotic rate. *J Surg Oncol*, 2011, 104: 379-385.
154. Chu VH, Tetzlaff MT, Torres-Cabala CA, Prieto VG, Bassett R, Gershenwald JE, McLemore MS, Ivan D, Wang WL, Ross MI, Curry JL. Impact of the 2009 (7th edition) AJCC melanoma staging system in the classification of thin cutaneous melanomas. *Biomed Res Int*, 2013, doi: 10.1155/2013/898719.
155. Balch CM, Gershenwalds JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 2009, 27(36): 6199- 6206.

156. Piris A, Mihm MC, Duncan LM. AJCC melanoma staging update: impact on the dermatopathology practice and patient management. *J Cutan Pathol*, 2011, 38: 394-400.
157. Köseoğlu N. Malign melanom ve endobronşial metastaz (iki olgu nedeniyle). *Türk Toraks Dergisi*, 2007, 8: 241-243.
158. Graham-Browwn R, Burns T. Lecture Notes of Dermatology. Çeviri: İnalöz S. *Dermatoloji Ders Notları*, 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: 77-93.
159. Erkurt MA, Aydoğdu İ, Kuku İ, Kaya E, Başaran Y. Nodular melanoma presenting with rapid progression and widespread metastases: a case report. *J Med Case Reports*, 2009, 3(50), doi: 10.1186/1752-1947-3-50.
160. Bosbous MW, Dzwierzynski WW, Neuburg M. Lentigo maligna: diagnosis and treatment. *Clin Plastic Surg*, 2010, 37: 35-46.
161. Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol*, 2009, 145(4): 427-434.
162. Mouawad R, Sebert M, Michels J, Bloch J, Spano JP, Khayat D. Treatment for metastatic malignant melanoma: old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010, 74: 27-39.
163. Shabir GA. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *J Chromotogr A*, 2003, 987: 57-66.
164. Paithankar HV. HPLC method validation for pharmaceuticals: a review. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences (IJUBS)*, 2013, 2: 229-240.

165. Bhardwaj SK, Dwivedi K, Agarwal DD. A review: HPLC method development and validation. *International Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 5: 76-81.
166. Donsi F, Sessa M, Ferrari G. Effect of Emulsifier Type and Disruption Chamber Geometry on the Fabrication of Food Nanoemulsions by High Pressure Homogenization. *Ind Eng Chem Res*, 2012, 51: 7606-7618.
167. Nemitz MC, Yatsu FK, Bidone J, Koester LS, Bassani VL, Garcia CV, Mendez AS, von Poser GL, Teixeira HF. A versatile, stability-indicating and high-throughput ultra-fast liquid chromatography method for the determination of isoflavone aglycones in soybeans, topical formulations, and permeation assays. *Talanta*, 2015, 134: 183-193.
168. Hussain A, Samad A, Singh SK, Ahsan MN, Haque MW, Faruk A, Ahmed FJ. Nanoemulsion gel-based topical delivery of an antifungal drug: in vitro activity and in vivo evaluation. *Drug Deliv*, 2016, 23: 642-647.
169. Jiang SP, He SN, Li YL, Feng DL, Lu XY, Du YZ, Yu HY, Hu FQ, Yuan H. Preparation and characteristics of lipid nanoemulsion formulations loaded with doxorubicin. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 3141-3150.
170. Sakloetsakun D, Dunnhaupt S, Barthelmes J, Perera G, Bernkop-Schnurch A. Combining two technologies: multifunctional polymers and self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral insulin administration. *Int J Biol Macromol*, 2013, 61: 363-372.
171. Silva AP, Nunes BR, De Oliveira MC, Koester LS, Mayorga P, Bassani VL, Teixeira HF. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. *Pharmazie*, 2009, 64: 32-35.

172. Schmid D, Züllli F. Penetration and metabolism of isoflavones in human skin. *Cosmetics & Toiletries*, 2003, 118: 71-74.
173. Mou D, Chen H, Du D, Mao C, Wan J, Xu H, Yang X. Hydrogel-thickened nanoemulsion system for topical delivery of lipophilic drugs. *Int J Pharm*, 2008, 353: 270-276.
174. Oliveira JS, Aguiar TA, Mezdari H, dos Santos ODH. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10: 13014-13018.
175. Celebi N, Ermis S, Ozkan S. Development of topical hydrogels of terbinafine hydrochloride and evaluation of their antifungal activity. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41: 631-639.
176. Pignatello R, Basile L, Puglisi G. Chitosan glutamate hydrogels with local anesthetic activity for buccal application. *Drug Deliv*, 2009, 16: 176-181.
177. Moreira de Moraes J, David Henrique dos Santos O, Delicato T, Azzini Gonçalves R, Alves da Rocha-Filho P. Physicochemical Characterization of Canola Oil/Water Nano-emulsions Obtained by Determination of Required HLB Number and Emulsion Phase Inversion Methods. *J Dispers Sci Technol*, 2006, 27: 109-115.
178. Argenta DF, de Mattos CB, Misturini FD, Koester LS, Bassani VL, Simoes CM, Teixeira HF. Factorial design applied to the optimization of lipid composition of topical antiherpetic nanoemulsions containing isoflavone genistein. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9: 4737-4747.
179. Movasaghi Z, Rehman S, ur Rehman DI. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl Spectrosc Rev*, 2008, 43: 134-179.

180. Singh H, Singh S, Srivastava A, Tandon P, Bharti P, Kumar S, Maurya R. Conformational analysis and vibrational study of daidzein by using FT-IR and FT-Raman spectroscopies and DFT calculations. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2014, 120: 405-415.
181. Huang Z, Xia J, Li J, Gao X, Wang Y, Shen Q. Optimization and bioavailability evaluation of self-microemulsifying drug delivery system of the daidzein-nicotinamide complex. *RSC Advances*, 2016, 6: 112686-112694.
182. Pan H, Wang HB, Yu YB, Cheng BC, Wang XY, Li Y. Original research paper. A superior preparation method for daidzein-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complexes with improved solubility and dissolution: Supercritical fluid process. *Acta Pharm*, 2017, 67: 85-97.
183. Zhang Z, Huang Y, Gao F, Gao Z, Bu H, Gu W, Li Y. A self-assembled nanodelivery system enhances the oral bioavailability of daidzein: in vitro characteristics and in vivo performance. *Nanomedicine*, 2011, 6: 1365-1379.
184. Wang H, Xu HX, Zhang N, Hu LD. Enhancement of dissolution rate of daidzein in ternary solid dispersions. *Adv Mat Res*, 2012, 550-553: 1000-1004.
185. Oomah BD. Phytoestrogens. In: Hurst WJ (ed). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*, 1st ed. Washington, CRC Press, 2002.
186. Islam MA, Punt A, Spenkelink B, Murk AJ, Rolaf van Leeuwen FX, Rietjens IM. Conversion of major soy isoflavone glucosides and aglycones in in vitro intestinal models. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58: 503-515.
187. Bolaños-Vásquez MC, Werner D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod Gene-Inducing Flavonoids in Root Exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1997, 10: 339-346.

188. Shabir GA. A practical approach to validation of HPLC methods under current good manufacturing practices. *Journal of validation technology*, 2004, 10: 210-218.
189. Garcia-Celma MJ, Homs M, Morales D, Solans C. Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications. In: Sanchez-Dominguez M, Rodriguez-Abreu C (eds). *Nanocolloids: A Meeting Point for Scientists and Technologists*, Amsterdam, Elsevier, 2016: 377.
190. Baroli B, Lopez-Quintela MA, Delgado-Charro MB, Fadda AM, Blanco-Mendez J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen. *J Control Release*, 2000, 69: 209-218.
191. Dhawan B, Aggarwal G, Harikumar SL. Enhanced transdermal permeability of piroxicam through novel nanoemulgel formulation. *Int J Pharm Investig*, 2014, 4: 65-76.
192. Hassan AK. Effective Surfactants Blend Concentration Determination for O/W Emulsion Stabilization by Two Nonionic Surfactants by Simple Linear Regression. *Indian J Pharm Sci*, 2015, 77: 461-469.
193. Yuan C-D, Pu W-F, Wang X-C, Sun L, Zhang Y-C, Cheng S. Effects of Interfacial Tension, Emulsification, and Surfactant Concentration on Oil Recovery in Surfactant Flooding Process for High Temperature and High Salinity Reservoirs. *Energy & Fuels*, 2015, 29: 6165-6176.
194. Ngawhirunpat T, Worachun N, Opanasopit P, Rojanarata T, Panomsuk S. Cremophor RH40-PEG 400 microemulsions as transdermal drug delivery carrier for ketoprofen. *Pharm Dev Technol*, 2013, 18: 798-803.

195. Yorulmaz E. Schiff Bazlarının Termal Yöntemlerle İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2005.
196. Yatsu FKJ, Koester LS, Bassani VL. Isoflavone-aglycone fraction from Glycine max: a promising raw material for isoflavone-based pharmaceutical or nutraceutical products. *Rev Bras Farmacogn*, 2016, 26: 259-267.
197. Scheithauer EC, Li W, Ding Y, Harhaus L, Roether JA, Boccaccini AR. Preparation and characterization of electrosprayed daidzein-loaded PHBV microspheres. 2015, 158: 66-69.
198. The United States Convention. United States Pharmacopeia (USP 30- NF 25), 2007, 579.
199. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharm Sci*, 2001, 13: 123-133.
200. Gürsoy A. Giriş. İçinde: Gürsoy A (editör). *Kontrollü Salım Sistemleri*, 1. Baskı. İstanbul, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, 2002: 3-6.
201. Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharm*, 2007, 57: 315-332.
202. Sohail A, Gaurav KJ, Farhan JA, Roop KK, Neelu J, Zeenat IK, Sushama T. Investigation of Nanoemulsion System for Transdermal Delivery of Domperidone: Ex-vivo and in vivo Studies. *Current Nanoscience*, 2008, 4: 381-390.
203. Mazureki Campos P, Bentley MVLB, Thorchilin VP. Nanopreparations for skin cancer therapy. In: Grumezescu AM (ed). *Nanobiomaterials in Cancer*

- Therapy: Applications of Nanobiomaterials*, 1st ed. London, Elsevier, 2016: 1-28.
204. Chellapa P, Mohamed AT, Keleb EI, Elmahgoubi A, Eid AM, Issa YS, Elmarzugi NA. Nanoemulsion and nanoemulgel as a topical formulation. *IOSR Journal of Pharmacy*, 2015, 5: 43-47.
205. Passos SK, de Souza PEN, Soares PKP, Eid DRM, Primo FL, Tedesco AC, Lacava ZGM, Morais PC. Quantitative approach to skin field cancerization using a nanoencapsulated photodynamic therapy agent: a pilot study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2013, 6: 51-59.
206. Sengupta P, Chatterjee B. Potential and future scope of nanoemulgel formulation for topical delivery of lipophilic drugs. *Int J Pharm*, 2017, 526: 353-365.
207. Begur M, Pai VK, Gowda DV, Sristava AS, Raghundan HV, Shinde C, Manusri N. Enhanced permeability of cyclosporine from a transdermal applied nanoemulgel. *Der Pharmacia Sinica*, 2015, 6: 69-79.
208. Melanom yol haritası.
<http://kanser.gov.tr/Dosya/Medya/Haberler/Melanomyolharitasi.pdf>
209. Dünya Sağlık Örgütü. <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index2.html>. 24 Haziran 2017.
210. Pham J, Nayel A, Hoang C, Elbayoumi T. Enhanced effectiveness of tocotrienol-based nano-emulsified system for topical delivery against skin carcinomas. *Drug Deliv*, 2016, 23: 1514-1524.
211. Brownlow B, Nagaraj VJ, Nayel A, Joshi M, Elbayoumi T. Development and In Vitro Evaluation of Vitamin E-Enriched Nanoemulsion Vehicles Loaded with Genistein for Chemoprevention Against UVB-Induced Skin Damage. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 3510-3523.

212. Shakeel F, Ramadan W. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2010, 75: 356-362.
213. Monge-Fuentes V, Muehlmann LA, Longo JP, Silva JR, Fascineli ML, de Souza P, Faria F, Degterev IA, Rodriguez A, Carneiro FP, Lucci CM, Escobar P, Amorim RF, Azevedo RB. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. *J Photochem Photobiol B*, 2017, 166: 301-310.
214. Pund S, Pawar S, Gangurde S, Divate D. Transcutaneous delivery of leflunomide nanoemulgel: Mechanistic investigation into physicochemical characteristics, in vitro anti-psoriatic and anti-melanoma activity. *Int J Pharm*, 2015, 487: 148-156.
215. Vilela FM, Syed DN, Chamcheu JC, Calvo-Castro LA, Fortes VS, Fonseca MJ, Mukhtar H. Biotransformed soybean extract (BSE) inhibits melanoma cell growth and viability in vitro: involvement of nuclear factor-kappa B signaling. *PLoS One*, 2014, 9: e103248.
216. Dong X, Xu W, Sikes RA, Wu C. Combination of low dose of genistein and daidzein has synergistic preventive effects on isogenic human prostate cancer cells when compared with individual soy isoflavone. *Food Chem*, 2013, 141: 1923-1933.
217. Lo FH, Mak NK, Leung KN. Studies on the anti-tumor activities of the soy isoflavone daidzein on murine neuroblastoma cells. *Biomed Pharmacother*, 2007, 61: 591-595.
218. Bao C, Namgung H, Lee J, Park HC, Ko J, Moon H, Ko HW, Lee HJ. Daidzein suppresses tumor necrosis factor-alpha induced migration and invasion by inhibiting hedgehog/Gli1 signaling in human breast cancer cells. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 3759-3767.

219. Xiao JX, Huang GQ, Geng X, Qiu HW. Soy-derived isoflavones inhibit HeLa cell growth by inducing apoptosis. *Plant Foods Hum Nutr*, 2011, 66: 122-128.
220. Guo JM, Xiao BX, Liu DH, Grant M, Zhang S, Lai YF, Guo YB, Liu Q. Biphasic effect of daidzein on cell growth of human colon cancer cells. *Food Chem Toxicol*, 2004, 42: 1641-1646.
221. Lin YJ, Hou YC, Lin CH, Hsu YA, Sheu JJ, Lai CH, Chen BH, Lee Chao PD, Wan L, Tsai FJ. Puerariae radix isoflavones and their metabolites inhibit growth and induce apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 378: 683-688.
222. Shen Q, Li X, Li W, Zhao X. Enhanced intestinal absorption of daidzein by borneol/menthol eutectic mixture and microemulsion. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12: 1044-1049.
223. Song J, Fan X, Shen Q. Daidzein-loaded nanostructured lipid carriers-PLGA nanofibers for transdermal delivery. *Int J Pharm*, 2016, 501: 245-252.
224. Liu YY, Shao YH, Lu J. Preparation, properties and controlled release behaviors of pH-induced thermosensitive amphiphilic gels. *Biomaterials*, 2006, 27: 4016-4024.
225. Liang J, Tian YX, Fu LM, Wang TH, Li HJ, Wang P, Han RM, Zhang JP, Skibsted LH. Daidzein as an antioxidant of lipid: effects of the microenvironment in relation to chemical structure. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 10376-10383.
226. Renee J. Flavonoids. In: Harborne JB (ed). *Methods in Plant Biochemistry*, London, Academic Press, 2012: 283-323.
227. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The Systematic Identification of Flavonoids*. 1st ed. New York, Springer-Verlag, 1970: 179.

228. Chiu MH, Prenner EJ. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. *J Pharm Bioallied Sci*, 2011, 3: 39-59.
229. Lavanya G, Sunil M, Eswarudu MM, Eswaraiah MC, Harisudha K, Spandana BN. Analytical method validation: an updated review. *Int Pharm Sci Res*, 2013, 4: 1280-1286.
230. Söğüt-Ertaş Ö, Kayalı A. Analitik yöntem geçerliliğine kısa bir bakış. *Ankara Ecz Fak. Derg*, 2005, 34: 41-57.
231. Piskula MK, Yamakoshi J, Iwai Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. *FEBS Lett*, 1999, 447: 287-291.
232. Hussain A, Samad A, Singh SK, Ahsan MN, Faruk A, Ahmed FJ. Enhanced stability and permeation potential of nanoemulsion containing sefsol-218 oil for topical delivery of amphotericin B. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41: 780-790.
233. Marin E, Briceno MI, George CC. Method to produce curcumin oil-in water nanoemulsions as templates for drug carriers. *J Biotechnol Biomater*, 2016, 6: 247.
234. Khani S, Keyhanfar F, Amani A. Design and evaluation of oral nanoemulsion drug delivery system of mebupidine. *Drug Deliv*, 2016, 23: 2035-2043.
235. Prieto C, Calvo L. Performance of the Biocompatible Surfactant Tween 80, for the Formation of Microemulsions Suitable for New Pharmaceutical Processing. *Journal of Applied Chemistry*, 2013, 2013: 10.
236. Dinarvand R, Moghadam SH, Sheikhi A, Atyabi F. Effect of surfactant HLB and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique. *J Microencapsul*, 2005, 22: 139-151.

237. Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Iqbal Z, Khar RK, Aqil M, Talegaonkar S. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech*, 2009, 10: 69-76.
238. Shah R, Elridge D, Palombo E, Harding I. *Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability*. Springer International Publishing, 2015:11-22.
239. How CW, Abdullah R, Abbasalipourkabir R. Physicochemical properties of nanostructured lipid carriers as colloidal carrier system stabilized with polysorbate 20 and polysorbate 80. *Afr J Biotechnol*, 2011, 10: 1684-1689.
240. Qingyi X, Nakajima M, Liu Z, Shiina T. Soybean-based Surfactants and Their Applications. In: Tzi-Bun NG (editör). *Soybean applications and technology*, InTech, 2011: 341-364.
241. Fricker G, Kromp T, Wendel A, Blume A, Zirkel J, Rebmann H, Setzer C, Quinkert RO, Martin F, Muller-Goymann C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharm Res*, 2010, 27: 1469-1486.
242. Novamatrix. <http://www.novamatrix.biz/store/protasan-up-g-213>. 24 Haziran 2017.
243. Thomas L, Zakir F, Mirza MA, Anwer MK, Ahmad FJ, Iqbal Z. Development of Curcumin loaded chitosan polymer based nanoemulsion gel: In vitro, ex vivo evaluation and in vivo wound healing studies. *Int J Biol Macromol*, 2017, 101: 569-579.
244. More A, Ambekar AW. Development and characterization of nanoemulsion gel for topical drug delivery of nabumetone. *Int J Pharm Pharm Res*, 2016, 7: 126-157.
245. Salim N, Ahmad N, Musa SH, Hashim R, Tadros TF, Basri M. Nanoemulsion as a topical delivery system of antipsoriatic drugs. *RSC Advances*, 2016, 6: 6234-6250.

246. Marinova KG, Alargova RG, Denkov ND, Velev OD, Petsev DN, Ivanov IB, Borwankar RP. Charging of Oil–Water Interfaces Due to Spontaneous Adsorption of Hydroxyl Ions. *Langmuir*, 1996, 12: 2045-2051.
247. Dijkstra AJ, Segers JC. Production and refining of oils and fats. In: Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra AJ (eds). *The Lipid Handbook with CD-ROM*, London, CRC Press, 2007: 143-262.
248. Ragelle H, Crauste-Manciet S, Seguin J, Brossard D, Scherman D, Arnaud P, Chabot GG. Nanoemulsion formulation of fisetin improves bioavailability and antitumour activity in mice. *Int J Pharm*, 2012, 427: 452-459.
249. Chen Y, Zhang H, Yang J, Sun H. Improved Antioxidant Capacity of Optimization of a Self-Microemulsifying Drug Delivery System for Resveratrol. *Molecules*, 2015, 20: 21167-21177.
250. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review (part 1). *Trop J Pharm Res*, 2013, 12: 255-264.
251. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on properties of nano-drug delivery systems- a review (part 2). *Trop J Pharm Res*, 2013, 12: 265-273.
252. Choi A-J, Kim C-J, Cho Y-J, Hwang J-K, Kim C-T. Characterization of Capsaicin-Loaded Nanoemulsions Stabilized with Alginate and Chitosan by Self-assembly. *Food Bioprocess Tech*, 2011, 4: 1119-1126.
253. Mahfoudhi N, Ksouri R, Hamdi S. Nanoemulsions as potential delivery systems for bioactive compounds in food systems: preparation, characterization, and applications in food industry. In: Grumezescu AM (ed). *Emulsions*, 1st ed. London, Academic Press, 2016: 365-403.
254. Ribeiro RC, Barreto SM, Ostrosky EA, da Rocha-Filho PA, Verissimo LM, Ferrari M. Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing

- Opuntia ficus-indica (L.) mill extract as moisturizing agent. *Molecules*, 2015, 20: 2492-2509.
255. Wang L, Dong J, Chen J, Eastoe J, Li X. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *J Colloid Interface Sci*, 2009, 330: 443-448.
256. Oliveira AEMFM, Duarte JL, Cruz RAS, Conceição ECd, Carvalho JCT, Fernandes CP. Utilization of dynamic light scattering to evaluate Pterodon emarginatus oleoresin-based nanoemulsion formation by non-heating and solvent-free method. *Rev Bras Farmacogn*, 2017, 27: 401-406.
257. Sun H, Liu K, Liu W, Wang W, Guo C, Tang B, Gu J, Zhang J, Li H, Mao X, Zou Q, Zeng H. Development and characterization of a novel nanoemulsion drug-delivery system for potential application in oral delivery of protein drugs. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 5529-5543.
258. Hosseini S, Tarzi B, Gharachorloo M, Ghavami M, Bakhoda H. Optimization on the stability of linseed oil-in-water nanoemulsions generated by ultrasonic emulsification using response surface methodology (RSM). *Orient J Chem*, 2015, 31: 1223-1230.
259. Signet The Complete Excipient Company. <http://www.signetchem.com/content/upload/Lr99p3ProtasanUPG213Specification.pdf>. 24 Haziran 2017.
260. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*, 2006, 28: 359-370.
261. Blaak J, Wohlfart R, Schürer N. Treatment of Aged Skin with a pH 4 Skin Care Product Normalizes Increased Skin Surface pH and Improves Barrier Function:

- Results of a Pilot Study. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 2011, 1: 50-58.
262. Ngan CL, Basri M, Tripathy M, Abedi Karjiban R, Abdul-Malek E. Physicochemical Characterization and Thermodynamic Studies of Nanoemulsion-Based Transdermal Delivery System for Fullerene. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: 12.
263. Karthik P, Anandharamakrishnan C. Fabrication of a nutrient delivery system of docosahexaenoic acid nanoemulsions via high energy techniques. *RSC Adv*, 2016, 6: 3501-3513.
264. Jaworska M, Sikora E, Ogonowski J. Rheological Properties of Nanoemulsions Stabilized by Polysorbate 80. *Chem Eng Technol*, 2015, 38: 1469-1476.
265. Krahn CL, Raffin RP, Santos GS, Queiroga LB, Cavalcanti RL, Serpa P, Dallegrave E, Mayorga PE, Pohlmann AR, Natalini CC, Guterres SS, Limberger RP. Isoflurane-loaded nanoemulsion prepared by high-pressure homogenization: investigation of stability and dose reduction in general anesthesia. *J Biomed Nanotechnol*, 2012, 8: 849-858.
266. Dordevic SM, Radulovic TS, Cekic ND, Randelovic DV, Savic MM, Krajisnik DR, Milic JR, Savic SD. Experimental design in formulation of diazepam nanoemulsions: physicochemical and pharmacokinetic performances. *J Pharm Sci*, 2013, 102: 4159-4172.
267. Cekić ND, Đorđević SM, Savić SD, Savić S. A full factorial design in the formulation of diazepam parenteral nanoemulsions: physicochemical characterization and stability evaluation. *Advanced Technology*, 2015, 4: 69-77.

268. Wadhwa J, Asthana A, Shilakari G, Chopra AK, Singh R. Development and Evaluation of Nanoemulsifying Preconcentrate of Curcumin for Colon Delivery. *ScientificWorldJournal*, 2015, 2015: 13.
269. Food Drug and Administration. Dissolution methods. https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm. 24 Haziran 2017.
270. Phillips DJ, Pygall SR, Cooper VB, Mann JC. Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64: 1549-1559.
271. Jamzad S, Fassihi R. Role of surfactant and pH on dissolution properties of fenofibrate and glipizide—A technical note. *AAPS PharmSciTech*, 2006, 7: E17-E22.
272. Panizzon GP, Bueno FG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Preparation of Spray-Dried Soy Isoflavone-Loaded Gelatin Microspheres for Enhancement of Dissolution: Formulation, Characterization and in Vitro Evaluation. *Pharmaceutics*, 2014, 6: 599-615.
273. Aparna C, Srinivas P, Patnaik KSKR. Enhanced transdermal permeability of telmisartan by a novel nanoemulsion gel. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2015, 2015: 8.
274. Singhvi G, Singh M. In-vitro drug release characterization models. *Int J Pharm Sci Res*, 2011, 2011: 77-84.
275. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 2010, 67: 217-223.
276. Barakat N, Fouad E, Elmedany A. Formulation Design of Indomethacin-Loaded Nanoemulsion For Transdermal Delivery. *Pharm, Anal Acta*, 2011, 2.

277. Eid AMM, Baie SH, Arafat O. Development and stability evaluation of olive oil nanoemulsion using sucrose monoester laurate. *AIP Conference Proceedings*, 2012, 1502: 486-494.
278. Affandi MM, Julianto T, Majeed A. Development and stability evaluation of astaxanthin nanoemulsion. *Asian J Pharm Clin Res*, 2011, 4: 142-148.
279. Kale SN, Deore SL. Emulsion micro emulsion and nano emulsion : a review. *Sys Rev Pharm*, 2017, 8: 39-47.
280. Asmawati, Mustapha WAW, Yusop SM, Maskat MY, Shamsuddin AF. Characteristics of cinnamaldehyde nanoemulsion prepared using APV-high pressure homogenizer and ultra turrax. *AIP Conference Proceedings*, 2014, 1614: 244-250.
281. Mitri K, Shegokar R, Gohla S, Anselmi C, Muller RH. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: preparation, characterization, stability and performance. *Int J Pharm*, 2011, 414: 267-275.
282. Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, Rocha-Filho PA. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. *J Nanobiotechnology*, 2011, 9: 44-44.
283. Parveen R, Baboota S, Ali J, Ahuja A, Ahmad S. Stability studies of silymarin nanoemulsion containing Tween 80 as a surfactant. *J Pharm Bioallied Sci*, 2015, 7: 321-324.
284. Sevcikova P, Vltavska P, Kasparkova V, Krejci J. Formation, characterization and stability of nanoemulsions prepared by phase inversion. In: Demiralp M, Bojkovic Z, Repanovici A (eds). *Mathematical Methods and Techniques in Engineering and Environmental Science*, 1st ed. Catania, WSEAS Press, 2011: 132-137.

285. Sulaiman ISC, Basri M, Masoumi HRF, Ashari SE, Ismail Z. Design and development of a nanoemulsion system containing extract of *Clinacanthus nutans* (L.) leaves for transdermal delivery system by D-optimal mixture design and evaluation of its physicochemical properties. *RSC Adv*, 2016, 6: 67378-67388.
286. Liang R, Xu S, Shoemaker CF, Li Y, Zhong F, Huang Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *J Agric Food Chem*, 2012, 60: 7548-7555.
287. Eid AM, Hesham AE, Aziz R, Nagip AE. Preparation, Characterization and Anti-Inflammatory Activity of *Swietenia macrophylla* Nanoemulgel. *J Nanomed Nanotechnol*, 2014, 5: 190-200.
288. Ali MS, Alam MS, Alam N, Siddiqui MR. Preparation, characterization and stability study of dutasteride loaded nanoemulsion for treatment of benign prostatic hypertrophy. *Iran J Pharm Res*, 2014, 13: 1125-1140.
289. Parthasarathi S, Muthukumar SP, Anandharamakrishnan C. The influence of droplet size on the stability, in vivo digestion, and oral bioavailability of vitamin E emulsions. *Food Funct*, 2016, 7: 2294-2302.
290. Ziani K, Fang Y, McClements DJ. Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: Effect of composition and storage conditions. *Food Res Int*, 2012, 46: 209-216.
291. Hashtjin AM, Abbasi S. Optimization of ultrasonic emulsification conditions for the production of orange peel essential oil nanoemulsions. *J Food Sci Technol*, 2015, 52: 2679-2689.
292. Rostagno McA, Palma M, Barroso CG. Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects. *Food Chem*, 2005, 93: 557-564.

293. Ungar Y, Osundahunsi OF, Shimoni E. Thermal stability of genistein and daidzein and its effect on their antioxidant activity. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 4394-4399.
294. Alzorqi I, Ketabchi MR, Sudheer S, Manickam S. Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrason Sonochem*, 2016, 31: 71-84.
295. Casagrande F, Darbon JM. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61: 1205-1215.
296. Chang C-J, Tsai T-Y. Antimelanogenic effects of the novel melanogenic inhibitors daidzein and equol, derived from soymilk fermented with *Lactobacillus plantarum* strain TWK10, in B16F0 mouse melanoma cells. *J Funct Foods*, 2016, 22: 211-223.
297. He Y, Wu X, Cao Y, Hou Y, Chen H, Wu L, Lu L, Zhu W, Gu Y. Daidzein exerts anti-tumor activity against bladder cancer cells via inhibition of FGFR3 pathway. *Neoplasma*, 2016, 63: 523-531.
298. Lo Y-L. A Potential Daidzein Derivative Enhances Cytotoxicity of Epirubicin on Human Colon Adenocarcinoma Caco-2 Cells. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 158-176.
299. Choi EJ, Kim GH. Antiproliferative activity of daidzein and genistein may be related to ER α /c-erbB-2 expression in human breast cancer cells. *Mol Med Rep*, 2013, 7: 781-784.
300. Sun MY, Ye Y, Xiao L, Rahman K, Xia W, Zhang H. Daidzein: A review article of pharmacological effects. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2016, 13: 117-132.

301. Iovine B, Iannella ML, Gasparri F, Monfrecola G, Bevilacqua MA. Synergic Effect of Genistein and Daidzein on UVB-Induced DNA Damage: An Effective Photoprotective Combination. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 8.
302. Phromnoi K, Yodkeeree S, Anuchapreeda S, Limtrakul P. Inhibition of MMP-3 activity and invasion of the MDA-MB-231 human invasive breast carcinoma cell line by bioflavonoids. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 1169-1176.
303. Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 179: 661-667.
304. Lim T-G, Kim J-E, Lee S-Y, Park JS, Yeom MH, Chen H, Bode AM, Dong Z, Lee KW. The Daidzein Metabolite, 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone, Is a Novel Inhibitor of PKC α in Suppressing Solar UV-Induced Matrix Metalloproteinase 1. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 21419-21432.
305. Zhao D, Shi Y, Dang Y, Zhai Y, Ye X. Daidzein stimulates collagen synthesis by activating the TGF-beta/smad signal pathway. *Australas J Dermatol*, 2015, 56: e7-14.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
<p>Adı Soyadı : Afife Büşra UĞUR Doğum tarihi : 25.05.1989 Doğum yer: Ankara Medeni hali : Bekar Uyruğu: TC Adres : Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Tel : 05331678385 E-mail : afife.busra.ugur@gmail.com busra.ugur@atauni.edu.tr</p>
Eğitim
<p>İlköğretim : Mesa Koru Sitesi İlköğretim Okulu (Ankara) Lise : Nermin Mehmet Çekiç Anadolu Lisesi (Ankara) Lisans : Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi</p>
Yabancı Dil Bilgisi
Orta Seviye (YDS 2014-Bahar Dönemi: 67.5)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Eczacılık Fakültesi Dekanlığı
Etik Alt Kurulu



Sayı : 93722986.12/439
Konu: Etik Alt Kurul Kararı

25/05/2015

Sayın Doç. Dr. Meltem ÇETİN

İlgi: 21.05.2015 tarih ve 490 sayılı dilekçeniz.

Fakültemiz Etik Alt Kurulunun 25.05.2015 tarihinde almış olduğu 06' nolu kararı ile "Topikal Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı Doktora öğrenciniz Afife Büşra UĞUR ile beraber yürüteceğiniz çalışmanızın etik kurulumuz tarafından kabulüne karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Zühal GÜVENALP
Etik Alt Kurul Başkanı

TOPLANTI TARİHİ: 25.05.2015
TOPLANTI SAYISI: 5

Karar -06- Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Meltem ÇETİN'in yürütücülüğünde Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında yürütülecek olan "Topikal Nanoemülsiyon Formülasyonlarının Geliştirilmesi ve *In Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı araştırma çalışması ile ilgili 21.05.2015 tarih ve 490 sayılı yazısı ile ekleri görüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğunun mevcut oybirliği ile kabulüne karar verildi.