

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURKUMİN YÜKLÜ TOPIKAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ  
VE KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Beyza Sümeyye AYDIN**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali Asram SAĞIROĞLU**

**ŞUBAT 2025**

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KURKUMİN YÜKLÜ TOPIKAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ  
VE KARAKTERİZASYONU**

**DOKTORA TEZİ**

**Beyza Sümeyye AYDIN  
195314003**

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**Biyoteknoloji Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ali Asram SAĞIROĞLU**

**ŞUBAT 2025**

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195314003 numaralı Doktora Öğrencisi Beyza Sümeyye AYDIN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “KURKUMİN YÜKLÜ TOPİKAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

**Tez Danışmanı :** **Doç. Dr. Ali Asram SAĞIROĞLU** .....  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

**Jüri Üyeleri :** **Prof. Dr. Neslihan ÜSTÜNDAĞ OKUR** .....  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Burak ÇELİK** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Dr. Öğr. Üyesi Dilek ÖZTÜRK CİVELEK** .....  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

**Dr. Öğr. Üyesi Mustafa GÖKÇE** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Doç. Dr. Gizem TIRIS** .....  
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

**Teslim Tarihi** :  
**Savunma Tarihi** : 12 Şubat 2025

*“Zambaklar en ıssız yerlerde açar ve vardır her vahşi çiçekte gurur”  
Zorlandığım vakitlerde her anlamda daha iyi ve olgun bir insan olmama vesile  
olan kıymetli aileme, dağlara, ormanlara, kuşlara, kazlarımıza, denizlere,  
yağmurlara ve çiçeklere,*



## ÖNSÖZ

Doktora sürecimin başlangıcından sonuna dek her alanda cömertçe bilgisini ve tecrübesini aktararak beni yönlendiren, ihtiyaç duyduğumda vakit ayıran, zorlu ve karmaşık deney süreçlerinde yol gösteren, bu uzun yolculuğun sonuna gelmemin vesilesi ile mümkün olduğu kıymetli danışmanım Doç. Dr. Ali Asram SAĞIROĞLU'na teşekkür ederim.

Başvuruların bitmesine bir gün kala bizzat arayıp haberdar eden ve doktora sürecine başlamama vesile olan, süreç boyunca desteğini ve varlığını daima hissettiğim Prof. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL'e teşekkür ederim.

Tez kapsamında beni çok heyecanlandıran üç boyutlu insan derisi doku modeli çalışmasını mümkün kılan, daima gülyüz ile karşılayan, hafta sonları dahi laboratuvarında çalışmalar gerçekleştirdiğimiz, hücre namına birçok hususu kendisinden öğrendiğim Dr. Öğr. Üyesi Dilek ÖZTÜRK CİVELEK'e teşekkür ederim.

Bu çalışma 20210603 numaralı BAP ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi ve 28117 numaralı proje ile Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenmiştir. Bu tez, TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurtiçi Doktora Burs Programı kapsamında da desteklenmiştir.

Doktora sürecine birlikte başladığımız, süreç boyunca birbirimizin iniş ve çıkışlarına şahitlik ve eşlik ettiğimiz, birbirimize destek olduğumuz ve beraber aldığımız ilk doktora dersi hala zihnimde olan arkadaşlarım Hatice Kübra BATU'ya ve Gizem İĞDELİ'ye teşekkür ederim.

Eğitim hayatım dahil olmak üzere her anlamda beni daima daha iyi bir insan olmaya, kendimi geliştirmeye, aşmaya teşvik eden, tecrübelerinden çokça yararlandığım ve her danıştığım da yol göstererek hayat yolculuğumda net bir şekilde ilerlememe vesile olan, desteklerini daima hissettiğim kıymetli aileme teşekkür ederim.

Şubat 2025

Beyza Sümeyye AYDIN  
Eczacı

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Beyza Sümeyye AYDIN

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER .....	vi
KISALTMALAR .....	ix
SEMBOLLER .....	xi
TABLO LİSTESİ .....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY .....	xvi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Deri.....	5
2.2 Derinin Yapısı .....	5
2.2.1 Epidermis .....	6
2.2.2 Dermis .....	8
2.2.3 Hipodermis .....	8
2.3 Deriden Emilim ve Geçiş Mekanizmaları.....	8
2.4 Deriden Emilimi ve Geçiş Etkileyen Unsurlar .....	10
2.5 Deri İrritasyonu ve Mekanizması.....	10
2.6 Biyoaktif Bileşenler .....	11
2.6.1 Kurkumin .....	12
2.6.2 Turmeron.....	16
2.7 Nanotaşıyıcı Sistemler .....	16
2.8 Katı Lipit Nanopartikül .....	17
2.8.1 Katı lipit nanopartikül bileşenleri.....	19
2.8.2 Katı lipit nanopartikül hazırlanırken kullanılan yöntemler.....	19
2.8.2.1 Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi.....	20
2.8.2.2 Mikroemülsiyon bazlı yöntem .....	21
2.8.2.3 Çözücü emülsifikasyon-buharlaştırma yöntemi.....	21
2.8.2.4 Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi.....	21
2.8.3 Katı lipit nanopartiküllerin stabilitesi.....	22
2.8.4 Katı lipit nanopartiküllerin karakterizasyonu.....	23
2.8.4.1 Partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımı .....	23
2.8.4.2 Partikül şekli ve morfolojisi .....	23
2.8.4.3 Zeta potansiyeli .....	23
2.8.4.4 Etkin madde miktar tayini ve enkapsülasyon etkinliği.....	23
2.8.4.5 İn-vitro etkin madde salımı .....	24
2.8.5 Katı lipit nanopartiküllerin uygulama alanları .....	24
2.9 Kalite Tasarım.....	25
2.9.1 İlaçta Tasarım Yoluyla Kalite .....	26

2.9.2 Deneysel Tasarım.....	26
2.10 Deri İritasyonunun Belirlenmesi .....	27
2.10.1 Hücre sitotoksosite testleri .....	30
2.10.2 MTT testi.....	31
2.10.3 Üç boyutlu kültür sistemleri ve doku modelleri.....	32
2.10.3.1 İnsan derisi doku modelleri.....	35
2.10.3.2 İritasyonun Saptanmasına Yönelik Doku Modelleri .....	37
2.10.3.3 Üç boyutlu yeniden yapılandırılmış insan epidermal (RhE) modeli EpiDerm™ .....	40
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>43</b>
3.1 Kullanılan Maddeler ve Cihazlar .....	43
3.1.1 Kullanılan Maddeler.....	43
3.1.2 Kullanılan Cihazlar ve Araç Gereçler .....	44
3.2 Yöntem.....	44
3.2.1 Aktif bileşenlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile standart doğrularının çizilmesi .....	44
3.2.1 Analitik yöntem validasyonu .....	46
3.2.1.1 Doğrusallık.....	46
3.2.1.2 Doğruluk ve geri elde edilebilirlik .....	46
3.2.1.3 Kesinlik .....	47
3.2.1.3.1 Tekrar edilebilirlik .....	47
3.2.1.3.2 Tekrar elde edilebilirlik.....	47
3.2.1.4 Özgünlük, seçicilik.....	48
3.2.1.5 Teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ) .....	48
3.2.2 Katı lipit nanopartikül formülasyonunun geliştirilmesi .....	48
3.2.3.1 Deneysel tasarım .....	49
3.2.3.2 Partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerlerinin ölçümü .....	51
3.2.3.3 Enkapsülasyon etkinliği .....	51
3.2.3.4 Katı lipit nanopartikül formülasyonlarındaki etken madde miktar tayini .....	51
3.2.4 Katı lipit nanopartiküllerin morfolojik analizi .....	52
3.2.5 Katı lipit nanopartikül formülasyonlarının stabilite çalışmaları .....	52
3.2.6 Katı lipit nanopartikül formülasyonundan in-vitro salım çalışması.....	52
3.2.7 Üç boyutlu doku modeli EpiDerm™ ile in-vitro deri iritasyon çalışması .....	53
3.2.7.1 Maruziyet öncesi EpiDerm™ dokularının hazırlanması.....	53
3.2.7.2 Dozlama ve test maddelerine maruziyet .....	55
3.2.7.3 MTT canlılık testi.....	57
3.2.8 İstatistiksel analiz .....	59
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>60</b>
4.1 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemi.....	60
4.1.1 Aktif bileşenlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile standart doğrularının çizilmesi .....	60
4.2 Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular .....	62
4.2.1 Doğrusallık.....	62
4.2.2 Doğruluk ve geri elde edilebilirlik .....	62
4.2.3 Kesinlik .....	63
4.2.3.1 Tekrar edilebilirlik .....	63
4.2.3.2 Tekrar elde edilebilirlik.....	64

4.2.4 Özgünlük, seçicilik.....	65
4.2.5 Teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ) .....	65
4.3 Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Geliştirilmesi .....	65
4.3.1 Katı lipit nanopartikülün deneysel tasarımı ve optimizasyonu .....	65
4.3.1.1 Bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi.....	68
4.3.1.2 Bağımsız değişkenlerin partikül boyutu üzerine etkisi .....	72
4.3.2 Katı lipit nanopartikülün optimizasyon çalışması.....	76
4.3.3 Katı lipit nanopartikül formülasyonlarındaki etken madde miktar tayini .	83
4.4 Katı Lipit Nanopartiküllerin Morfolojik Analizi .....	84
4.5 Katı Lipit Nanopartiküllerin Stabilitate Çalışması.....	85
4.6 Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonundan İn-Vitro Salım Çalışması.....	87
4.7 Üç Boyutlu Doku Modeli Epiderm™ İle İn-Vitro Deri İritasyon Çalışması .	90
<b>5. SONUÇLAR .....</b>	<b>100</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>103</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>125</b>



## KISALTMALAR

<b>ACN</b>	: Asetonitril
<b>BSS</b>	: Relatif standart sapma
<b>C888</b>	: Compritol® 888 ATO
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz
<b>CSF</b>	: Koloni uyarıcı faktör
<b>DPBS</b>	: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
<b>ECVAM</b>	: Avrupa Birliği Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi
<b>EE</b>	: Enkapsülasyon etkinliği
<b>ESEM</b>	: Çevresel taramalı elektron mikroskopu
<b>FESEM</b>	: Emisyonlu taramalı elektron mikroskopu
<b>FDA</b>	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
<b>HaCaT</b>	: İnsan keratinosit hücre hattı
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>KLN</b>	: Katı lipit nanopartikül
<b>LOD</b>	: Tayin limiti
<b>LOQ</b>	: Teşhis limiti
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
<b>NF-κB</b>	: Nükleer faktör kappa-B
<b>NLT</b>	: Nanoyapılı lipit taşıyıcı
<b>OD</b>	: Optik yoğunluk
<b>OECD</b>	: Ekonomik Kalkınma ve İş Birliği Örgütü
<b>ORT</b>	: Ortalama
<b>P810</b>	: Plantacare® 810
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponu çözeltisi
<b>PDGF</b>	: Platelet kaynaklı büyüme faktörü
<b>PDI</b>	: Polidispersite indeksi
<b>PEG</b>	: Polietilen glikol
<b>PS</b>	: Partikül büyüklüğü
<b>r<sup>2</sup></b>	: Determinasyon katsayısı
<b>RhE</b>	: Yeniden yapılandırılmış insan epidermisi
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SS</b>	: Standart sapma
<b>TEM</b>	: Geçirimli elektron mikroskopu
<b>TİTCK</b>	: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
<b>TGF-α</b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü alfa
<b>TGF-β</b>	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TNF-α</b>	: Tümör nekroz faktörü alfa
<b>UPW</b>	: Ultrasaf su
<b>UVA</b>	: Ultraviyole A
<b>UVB</b>	: Ultraviyole B
<b>VK</b>	: Varyasyon katsayısı

<b>YBSK</b>	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
<b>YEM</b>	: Yüzey etkin madde
<b>YK</b>	: Yükleme kapasitesi
<b>Y/S</b>	: Su içinde yağ
<b>YYEM</b>	: Yardımcı yüzey etkin madde
<b>YYM</b>	: Yanıt Yüzey Metodolojisi
<b>ZP</b>	: Zeta potansiyeli
<b>2B</b>	: İki boyutlu
<b>3B</b>	: Üç boyutlu



## SEMBOLLER

<b>a</b>	: Ağırlık
<b>g</b>	: Gram
<b>h</b>	: Hacim
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>rpm</b>	: Dakikada tur sayısı
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1</b> : Deri reaksiyonlarının derecelendirilmesi.....	28
<b>Tablo 4.1</b> : Kurkumin'e ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik değerleri.....	63
<b>Tablo 4.2</b> : Turmeron'a ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik değerleri. ....	63
<b>Tablo 4.3</b> : Kurkumin için tekrar edilebilirlik değerleri.....	64
<b>Tablo 4.4</b> : Turmeron için tekrar edilebilirlik değerleri. ....	64
<b>Tablo 4.5</b> : Kurkumin için tekrar elde edilebilirlik değerleri. ....	64
<b>Tablo 4.6</b> : Turmeron için tekrar elde edilebilirlik değerleri.....	65
<b>Tablo 4.7</b> : Etken madde Kurkumin'e ait teşhis sınırı ve tayin sınırı değerleri. ....	65
<b>Tablo 4.8</b> : Etken madde Turmeron'a ait teşhis sınırı ve tayin sınırı değerleri.....	65
<b>Tablo 4.9</b> : Merkezi kompozit tasarım matrisi ve KLN için elde edilen yanıtlar. ..	68
<b>Tablo 4.10</b> : Kurkumin'in enkapsülasyon etkinliği için ANOVA sonuçları. ....	68
<b>Tablo 4.11</b> : Partikül boyutu için ANOVA sonuçları.....	73
<b>Tablo 4.12</b> : Optimizasyonu yapılmış KLN'nin öngörülen ve deneysel yanıtları.....	76

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.1 : Derinin yapısı. ....	6
Şekil 2.2 : İnsan keratinosit hücre hattı; (A) Işık mikrografları, (B) elektron mikrografları. ....	7
Şekil 2.3 : İlaçların deriden geçiş yolları. ....	9
Şekil 2.4 : Lokal dermal irritasyona yol açan enflamatuvar basamakların şematik gösterimi. ....	11
Şekil 2.5 : <i>Curcuma longa</i> 'dan zerdeçala ve Kurkumin'e: geleneksel ve ticari kullanımları. ....	12
Şekil 2.6 : Kurkumin'in kimyasal yapısı. ....	13
Şekil 2.7 : Kurkumin'in çeşitli deri hastalıkları üzerine etki mekanizması. ....	14
Şekil 2.8 : Turmeron'un yapısı. ....	16
Şekil 2.9 : 25 Mart 2024 tarihli "katı lipit nanopartiküller" anahtar kelimeleriyle WoS portalında yapılan aramada elde edilen son 30 yıla ait yayın ve atıf sayısı verileri. ....	17
Şekil 2.10 : KLN'nin şematik morfolojileri. ....	19
Şekil 2.11 : Sıcak ve soğuk homojenizasyon yöntemleriyle KLN hazırlama. ....	20
Şekil 2.12 : Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile KLN hazırlama basamakları. ....	22
Şekil 2.13 : MTT testinin aşamaları. ....	31
Şekil 2.14 : Biyobaskı sürecinin aşamaları. ....	35
Şekil 2.15 : Üç boyutlu yeniden yapılandırılmış epidermal modelin oluşturulma basamakları. ....	36
Şekil 2.16 : Deri irritasyon modelindeki kontrollerin histolojik kesitleri (Kesikli çizgi; dermis, düz çizgi; epidermis, mor doku; canlı doku, beyaz doku; hücre ölümü). ....	37
Şekil 2.17 : TOC-DiONLT'lerin <i>in-vitro</i> deri emilimine ait görüntüler. (A) İnsan epidermis modeli kesiti. (Mavi; hücre çekirdekleri, yeşil; TOC-DiONLT) (B) Hücre etrafındaki yapıyı gösteren (A) modele ait kesit. ....	37
Şekil 2.18 : (A) <i>İn-vivo</i> insan epidermisi ve (B) 3B insan epidermis modeli (SkinEthic Laboratories) için histolojik kesit karşılaştırması. ....	39
Şekil 2.19 : EpiDerm™ uygulamasına dair şematik gösterim. ....	39
Şekil 2.20 : Rastgele seçilmiş EpiDerm™ numunelerinin histolojik kesitleri. ....	41

<b>Şekil 3.1</b> : Kullanılan YBSK cihazı.....	45
<b>Şekil 3.2</b> : KLN'lerin hazırlanılmasını kapsayan basamaklar (Biorender ile oluşturulmuştur.).....	49
<b>Şekil 3.3</b> : EpiDerm™ dokularını içeren plaka. ....	54
<b>Şekil 3.4</b> : (A) Temin edilen EpiDerm™ dokularını içeren plakanın lot numarası. (B) Dokuya ait ilk mikroskop görüntüsü. ....	54
<b>Şekil 3.5</b> : EpiDerm™ dokularının besiyeri (EPI-100-NMM).....	55
<b>Şekil 3.6</b> : EpiDerm™ kiti içerisindeki DPBS. ....	56
<b>Şekil 3.7</b> : EpiDerm™ dokularını özütleme aşamasının ardından plakada kalan her bir dokunun özütüne ait görüntüler. ....	58
<b>Şekil 4.1</b> : Kurkumin'e ait standart eğrisi ve denklemi. ....	61
<b>Şekil 4.2</b> : Turmeron'a ait standart eğrisi ve denklemi.....	61
<b>Şekil 4.3</b> : KLN'nin Kurkumin için enkapsülasyon etkinliği değerlerine ait üç boyutlu yanıt yüzey grafiği. ....	70
<b>Şekil 4.4</b> : KLN'nin partikül boyutu değerlerine ait üç boyutlu yanıt yüzey grafiği. ....	74
<b>Şekil 4.5</b> : Optimum KLN formülasyonunun partikül boyutu verileri. ....	77
<b>Şekil 4.6</b> : Optimum KLN formülasyonunun zeta potansiyeli verileri.....	78
<b>Şekil 4.7</b> : Optimize edilmiş KLN'ye ait ESEM görüntüsü. ....	84
<b>Şekil 4.8</b> : Optimum KLN'nin stabilite çalışmalarının sonucu.....	85
<b>Şekil 4.9</b> : Salım çalışması neticesinde oluşturulan % Kurkumin ve % Turmeron salım grafiği.....	87
<b>Şekil 4.10</b> : Negatif kontrol (NK, DPBS), Pozitif kontrol (PK, % 5 SDS), Kurkumin ve Turmeron, Kurkumin ve Turmeron yüklü KLN ve boş KLN için EpiDerm™ ile gerçekleştirilen in-vitro irritasyon çalışması sonuçları (*p<0,05).....	90

## KURKUMİN YÜKLÜ TOPİKAL FORMÜLASYONLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

### ÖZET

Yaygın şekli ile zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa L.*; rizomunda bulunan biyoaktif bileşiklere, özellikle Kurkumin'e ve Turmeron'a atfedilen terapötik etkileri ile tanınmaktadır. Bu bileşikler; antiinflamatuvar, antioksidan ve anti-tümör etkileri dahil olmak üzere çeşitli terapötik özellikler sergilemektedir. Bununla birlikte, bu bileşiklerin topikal olarak uygulanması deri üzerinde irritasyona neden olma konusunda önemli bir potansiyel taşımaktadır. Bu çalışma kapsamında, deride görülen irritasyon olasılığının azaltılmasına yönelik Kurkumin ve Turmeron yüklü katı lipit nanopartiküllerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Katı lipit nanopartikül formülasyonları yüksek devirli homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmış ve yanıt yüzey metodolojisi uygulanarak optimize edilmiştir. Katı lipit Compritol® 888 ATO (gliseril behenat) ve yüzey aktif madde Plantacare® 810 (kapril glukozit) miktarları bağımsız değişkenler, enkapsülasyon etkinliği ve partikül boyutu ise yanıtlar olarak belirlenmiştir. Hazırlanan bütün formülasyonlara belirlenen kritik parametreler öncülünde deneysel tasarım çalışmaları uygulanmıştır. Katı lipit miktarının artırılması, enkapsülasyon etkinliği değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmıştır. Yüzey aktif madde miktarının artmasının da enkapsülasyon etkinliğini olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Partikül boyutu incelendiğinde ise, Plantacare® 810 miktarındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bir etki gösterirken Compritol® 888 ATO miktarındaki değişikliklerin boyut üzerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermediği görülmüştür. Optimize edilmiş katı lipit nanopartikül formülasyonu Kurkumin ve Turmeron için yüksek oranda enkapsülasyon etkinliği göstermiştir. Elde edilen nanopartiküllerin küresel ve homojen bir şekle sahip olduğu çevresel taramalı elektron mikroskopu görüntüleri ile doğrulanmıştır. *In-vitro* salım çalışması için sink koşulları sağlanmış olup 24 saatlik salım süresinin sonunda Kurkumin ve Turmeron için sırasıyla % 71,32 ± 3,73 ve % 67,23 ± 1,64 oranlarında kümülatif salım elde edilmiştir. Ayrıca formülasyonun stabilitesi fiziksel stabilite testleri ile doğrulanmış ve 5 ± 3°C'de en az 60 gün boyunca formülasyonun saklanabileceği gösterilmiştir. Özellikle, yeniden yapılandırılmış insan epidermal modeli EpiDerm™ kullanılarak yapılan *in-vitro* deri irritasyon çalışması neticesinde, enkapsüle edilmemiş Kurkumin ve Turmeron ile karşılaştırıldığında Kurkumin ve Turmeron yüklü katı lipit nanopartikül ile irritasyon düzeyinde önemli bir azalma olduğu ortaya konmuştur. Bu bulgular, irritasyon düzeylerinin azaltılmasına yönelik optimize edilmiş katı lipit nanopartikülün Kurkumin'in ve Turmeron'un çeşitli topikal kullanımları için uygun bir taşıyıcı sistemi olduğunu desteklemektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Kurkumin, Turmeron, Deri irritasyonu, Üç boyutlu yeniden yapılandırılmış insan epidermal modeli, Katı lipit nanopartikül, Yanıt yüzey yöntemi

## DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CURCUMIN LOADED TOPICAL FORMULATIONS

### SUMMARY

*Curcuma longa L.*, commonly known as turmeric, is renowned for its therapeutic benefits attributed to bioactive compounds, namely Curcumin and Turmerone, present in its rhizome. These compounds exhibit diverse therapeutic properties, including antiinflammatory, antioxidant, and antitumor effects. However, the topical application of these compounds has a significant potential for inducing skin irritation. This study focuses on the development of Curcumin and Turmerone loaded solid lipid nanoparticles intending to reduce irritation on the skin. Solid lipid nanoparticle formulations were prepared by a method using hot homogenization followed by ultrasonication procedures and optimized by applying response surface methodology. The amounts of solid lipid Compritol® 888 ATO (glyceryl behenate) and surfactant Plantacare® 810 (capryl glucoside) were determined as independent variables and encapsulation efficiency and particle size were determined as responses. Experimental design studies were applied to all prepared formulations under the premise of determined critical parameters. It was observed that increasing the solid lipid level led to a statistically significant increase in encapsulation efficiency, while increasing the amount of surfactant positively affected the encapsulation efficiency. When the particle size was analysed, it was observed that the changes in the amount of Plantacare® 810 showed a statistically significant effect, while the changes in the amount of Compritol® 888 ATO did not show a statistically significant effect on the size. The optimized solid lipid nanoparticle formulation demonstrated high entrapment efficiencies for Curcumin and Turmerone. The obtained nanoparticles were confirmed to be spherical and uniform in shape via environmental scanning electron microscopy images. The *in vitro* release study indicated cumulative releases of  $71.32 \pm 3.73\%$  for Curcumin and  $67.23 \pm 1.64\%$  for Turmerone after 24 hours under sink conditions. Physical stability tests confirmed the stability of the formulation, allowing storage at  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  for a minimum of 60 days. Notably, *in-vitro* skin irritation studies, utilizing the reconstructed human epidermal model EpiDerm™, revealed a significant reduction in irritation with the solid lipid nanoparticle containing Curcumin and Turmerone compared to nonencapsulated Curcumin and Turmerone. These findings support the optimized solid lipid nanoparticle as a suitable carrier system for various topical uses of Curcumin and Turmerone by reducing irritation levels.

**Keywords:** Curcumin, Turmerone, Skin irritation, Three dimensional reconstructed human epidermal model, solid lipid nanoparticle, Response surface methodology

## 1. GİRİŞ

*Curcuma longa L.* bitkisinden izole edilen başlıca biyoaktif bileşenler kurkuminoidler, seskiterpenoidler ve turmeronlardır [1]. *Curcuma longa L.*'nin kurutulmuş rizomlarından elde edilen Kurkumin, çeşitli terapötik etkileriyle bilinen polifenolik bir bileşiktir. Zerdeçal bitkisinin birincil terapötik bileşeni olarak Kurkumin; antioksidan, antienflamatuar, antimikrobiyal, antikanser, antipsoriatik ve yara iyileştirici aktiviteler sergilemektedir [2, 3].

Deri yaşlanması, deri enfeksiyonları, akne, sedef, egzama, dermatit gibi iltihaplı deri hastalıkları ve deri kanserinde terapötik aktiviteleri sebebiyle topikal olarak Kurkumin'den faydalanılmaktadır. Kurkumin'in deri üzerine ve deri hastalıklarına dair yüksek potansiyel taşıyan bir biyoaktif olduğu vurgulanmıştır [4-7]. Buna karşın herhangi bir terapötik ajan gibi Kurkumin'in de topikal uygulamalarda kullanımı deri irritasyonu potansiyeli başta olmak üzere çeşitli zorlukları beraberinde getirmektedir.

Kurkumin; deri bütünlüğünün bozulduğu, hassasiyetin arttığı deri hastalıklarında hızlı iyileşme sağlamasına karşın yanma, kaşıntı, kızarıklık gibi irritasyon ile sonuçlanan yan etkilere neden olabilmektedir [8]. Kızarıklık, kaşıntı ve hassasiyet ile karakterize olan deri irritasyonu; Kurkumin muhteva eden topikal ürünlerin geniş kitlelerce uygulanabilmesi adına önemli bir engel teşkil etmektedir. Gerçekleştirilen bir çalışmada, literatürde bildirilen ve Kurkumin içeren topikal uygulamalarda karşılaşılan kontakt dermatit (irritan kontakt dermatit dahil olmak üzere) vakaları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, Kurkumin'in antienflamatuar özelliklere sahip olmasına karşın deri için bir alerjen olduğu ifade edilmiştir [9, 10].

Yanı sıra polifenollerin yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterebilmeleri sebebiyle Kurkumin'in doğrudan deri üzerine uygulanması endişe uyandırmaktadır [11]. Kurkumin'in düşük çözünürlüğe sahip olması ve terapötik etkinliğe

ulaşılabilmesi için yüksek konsantrasyonların gerekliliği gibi faktörler de bu husustaki endişelerin artmasına katkıda bulunmaktadır [2, 12].

Zerdeçal ve uçucu yağında bulunan temel bileşenlerden biri olarak Aromatik Turmeron; anti-oksidan, anti-tümör ve anti-kanser aktiviteler göstermektedir [13-16]. Turmeron'un terapötik potansiyeli dermatoloji alanına bilhassa enflamatuar deri hastalıklarının yönetimine kadar uzanmaktadır. Özellikle topikal Turmeron uygulamaları ile murin modellerinde sitokin ifadeleri düzenlenerek deri iltihabı hafiflediğinden sedef gibi enflamatuar deri hastalıklarının tedavisi için Turmeron umut verici bir aday olarak görülmüştür [17].

Kurkumin ve Turmeron, zerdeçal bitkisinin rizomunda bir arada yer almaktadır. Çalışmalardan elde edilen veriler, tek başına Kurkumin'e kıyasla Turmeron varlığında Kurkumin emiliminin önemli ölçüde arttığını ve bu artışın her iki biyoaktifin sinerjistik etkilerini arttırdığını vurgulamaktadır [18-21]. Sinerjistik etkilerin araştırıldığı bir başka çalışmada standart Kurkumin ile karşılaştırıldığında Kurkumin'in ve Turmeron'un birlikte kullanımı ile antienflamatuar aktivitenin arttığı saptanmıştır [22, 23].

Dermatolojik formülasyonların yenilikçi dünyasında; lipozom, polimerik nanopartikül, lipit bazlı taşıyıcı ve nanoemülsiyon gibi taşıyıcı sistemlerin keşfi ile ilaç taşıma yöntemlerine dair çığır açan yaklaşımlar getirilerek daha fazla etkinlik ve daha az yan etki profili kazanılmıştır. Bu nanotaşıyıcı sistemler arasında özellikle topikal uygulamalar nezdinde katı lipit nanopartiküllerin (KLN) yeni bir yaklaşım olduğu belirtilmiştir [24, 25].

KLN'ler; polimerik nanopartiküllerin, emülsiyonların ve lipozomların avantajlarını bünyesinde bir araya getirmektedir. Bu nedenle, düşük çözünürlüğe sahip ilaçların formülasyonlarının geliştirilmesi üzere KLN'lerin kullanımı yeni bir bakış açısı sunmaktadır [26]. Çeşitli KLN'ler geliştirilmiş ve formülasyonlarında temel bileşenler olarak lipit, yüzey aktif madde ve suya ihtiyaç duyulduğu tespit edilmiştir. Kullanılan lipitler; mono, di ve trigliserit karışımlarından mumlara, doymuş yağlara, trigliseritlere, oda ve vücut sıcaklığının üzerinde erime noktasına sahip diğer lipit türlerine kadar uzanmaktadır [27].

Lipozomların aksine KLN'ler bozunmaya karşı gelişmiş stabilite ve koruma sağlayan katı lipit bir çekirdeğe sahiptir [28]. Polimerik nanopartiküllerin aksine KLN'ler,

biyolojik olarak parçalanabilen lipitlerden oluşmakta ve dolayısıyla uzun vadede toksisiteye ilişkin yaşanabilecek sorunları azaltmaktadır [29, 30]. Öte yandan, sahip olduğu katı lipit yapısı nedeniyle nanoemülsiyona kıyasla kontrollü ilaç salımı sağlamaktadır [31, 32].

Topikal olarak uygulandıklarında KLN'ler; derinin üst katmanına nüfuz etme, daha derin katmanlara ulaşma ve böylece hedef bölgelere ilaç taşınmasını iyileştirme konusunda dikkate değer bir potansiyel sergilemektedir [33]. Bu gelişmiş nüfuz, hem hidrofobik hem de hidrofilik ilaçların biyoyararlanımının artmasını mümkün kılmaktadır. Dahilindeki lipit bileşenlerin biyoyumlu olması deri üzerine uygulamaları hususunda KLN'lerin güvenlik profiline katkı sağlamaktadır [34, 35].

Topikal uygulamalar söz konusu olduğunda; olası deri irritasyonu, optimum deri geçirgenliğinin sağlanmasına dair güçlükler, ilacın stabilitesi, biyoyararlanım ve doz tutarlılığının korunması gibi zorluklarla karşılaşmaktadır [36, 37]. Geleneksel formülasyonlar, içerikleri ve tıkaçıcı yapıları sebebiyle deri irritasyonuna veya deri bariyeriyle etkileşime neden olabilmektedir [38]. Ancak KLN'ler biyoyumlu lipitlerden meydana gelen matriksleriyle bu sorunların giderilmesi üzere umut vaat etmektedir [39, 40]. İlave olarak prelinik çalışmalar ve patentler, Kurkumin yüklü lipit nanotaşıyıcıların deri hastalıklarında etkin bir ilaç taşıyıcı sistem olarak ticarileşebilme potansiyelini ortaya koymuştur [8].

Formülasyonların optimizasyonu, faktör etkileşimlerinin istenen sonuçları önemli ölçüde etkileyebildiği karmaşık değişkenlerden meydana gelen bir alanda ilerlemeyi gerektirmektedir. Geleneksel yaklaşımlar, diğer faktörler sabit tutulurken tek bir faktörün sistematik olarak ayarlanmasını içeren formülasyon tasarımının temel taşı oluşturmaktadır [41, 42]. Fakat bu yöntemler genellikle birden fazla değişken arasındaki karmaşık etkileşimleri algılamakta yetersiz kalmaktadır. Bu da yetersiz ve standartın altında formülasyonların elde edilmesine, fazlaca kaynak ve zaman gerektiren deneme yanılma süreçlerine yol açmaktadır.

Buna karşın yanıt yüzey metodolojisi (YYM) yöntemi, karmaşık tasarım uzayında verimli bir şekilde ilerlemek üzere tasarlanmış sağlam ve sistematik bir istatistiksel teknik olarak ortaya çıkmaktadır. YYM, birden fazla faktör ile yanıt arasındaki ilişkileri modelleyerek araştırmacıların değişkenlerin sinerjistik veya antagonistik etkilerini keşfetmelerine ve nihayetinde optimum formülasyon koşullarını

belirlemelerine olanak tanımaktadır. YYM, formülasyonun optimizasyon sürecini hızlandırmakla kalmayarak kapsamlı deneysel denemelere ve kaynaklara olan ihtiyacı en aza indirmektedir. Literatürde mevcut çok sayıda çalışma, geleneksel yaklaşımlara kıyasla daha az deneysel süreç ile optimum formülasyonlara ulaşılmasında YYM'nin üstün verimliliğini ortaya koymuştur [43, 44].

Tez çalışmasının irritasyonun değerlendirilmesi kısmında EpiDerm™'den yararlanılmıştır. Sıklıkla başvurulan bir model olan EpiDerm™, üç boyutlu (3B) *in-vitro* doku modelidir. İnsan epidermal keratinosit hücrelerinden oluşmakta ve yeniden yapılandırılmış insan epidermisini (RhE) 3B şekilde temsil etmektedir. Derinin üst tabakasının fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerini taklit etmektedir. Ayrıca hayvan testlerine alternatif olarak geliştirilmiş ve Avrupa Birliği Hayvan Testlerine Alternatif Testler Referans Laboratuvarı (EURL-ECVAM) tarafından valide edilmiştir. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK) tarafından nihai ürünler üzerinde gerçekleştirilmesi zorunlu deri irritasyon testlerinde kullanılmak üzere geçerli kabul edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında; Kurkumin ve Turmeron yüklü, güvenilir, etkili, yenilikçi bir topikal formülasyonun geliştirilmesi, karakterizasyonu ve deri irritasyon düzeylerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. KLN formülasyonu, yüksek devirli homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Merkezi kompozit tasarım (CCD) ile formülasyonların optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Takibinde formülasyonun karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Son aşamada ise KLN formülasyonu deri irritasyon düzeyleri açısından değerlendirilmiştir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

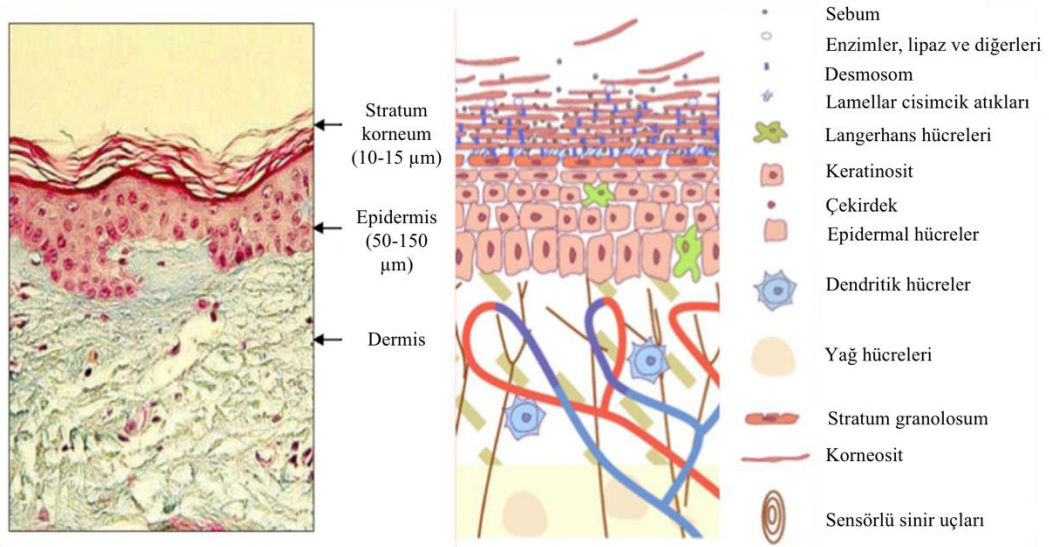
### **2.1 Deri**

Ortalama 1.6-1.8 m<sup>2</sup> alan ve 3-5 mm kalınlık ile vücudumuzu kaplayan en büyük organ olarak deri, insan vücudunun çevresel faktörlere ve tehditlere (patojenler, mikroorganizmalar vb.) karşı ilk kalkanı konumundadır [45-47]. Deri; nem kaybını, vücut ısısını ve kan basıncını düzenleyerek homeostazda rol almakla birlikte çevreyle temas halinde olan önemli bir duyu organı olarak sıcaklık, basınç ve ağrı şeklindeki uyarınları algılamaktadır [48]. Alerjenlere, serbest radikallere, irritasyona sebep olan maddelere, ultraviyole radyasyona maruziyet ve doku deformasyonuyla neticelenen fiziksel yaralanma kaynaklı kutanöz yaralar söz konusu olduğunda; uyum sağlamanın yanı sıra işlevlerini sağlıklı bir şekilde yerine getirebilmesi için derinin bütünlüğü temel parametredir [48-50].

Deri; sabit, esnek olmayan kısıtlayıcı bir sınır tabakasından ziyade habitat ile arayüzümüz olarak dinamik ve değişken bir şekilde işlevini sürdürmektedir [51]. Hem lokal hem de sistemik olarak hücresel ağları etkileyen biyolojik bir iletişim aracı olmasının yanı sıra minimum oranda dokulardan örnek alınabilmesini sağladığından toksikolojik sonuçların değerlendirilmesi açısından da kolay erişilebilir bir organ mahiyetindedir [52].

### **2.2 Derinin Yapısı**

Şekil 2.1’de detaylıca gösterildiği üzere deri; epidermis, dermis ve hipodermis olmak üzere üç ana tabakadan teşekkül etmektedir. Ayrıca saç folikülleri, ter kanalları, apokrin bezler ve tırnaklar gibi bu tabakalara eşlik eden çeşitli uzantıları da muhteva etmektedir [53-55].



**Şekil 2.1** : Derinin yapısı [51].

İnsan epidermal lipit kompozisyonu genel itibariyle fosfolipitler (fosfatidilkolin, fosfatidilserin), sfingolipitler (glikosfingolipitler, seramidler), nötr lipitler (yağ asitleri, hidrokarbonlar, steroller) ve kolesterol sülfattan oluşmaktadır [56]. Deri katmanlarının bozulması, stratum corneumda yer alan protein ve lipit yapılarının bozulmasına ve ortadan kaldırılmasına yol açmaktadır [49].

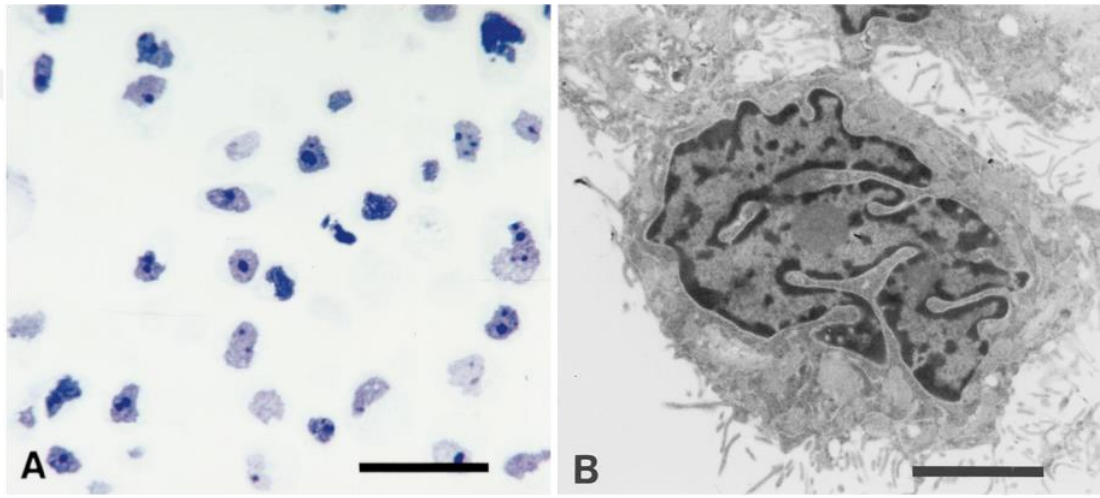
### 2.2.1 Epidermis

Epidermis, kılcal damar veya duysal sinir içermeyen tabakalı yassı bir epiteldir [57]. Epidermis; deri homeostazının korunmasında kritik rol oynayarak vücudu; su kaybından, fiziksel, kimyasal ve enfeksiyöz tehditlerden korumaktadır. Aynı zamanda, taze keratinositlerin üretilmesi yoluyla sürekli yenilenen oldukça aktif bir dokudur [58]. Derinin dış tabakasını teşkil eden epidermisin ana hücreleri olan keratinositler, keratinizasyon süreci boyunca farklılaşmaya uğrayarak stratum korneum gibi derinin farklı katmanlarını oluşturmaktadır [57-59].

Stratum korneum; 10-15 µm kalınlığında olup keratinositlerin son derece farklılaşmış hali olan yassılaştırmış, çekirdeksiz ve ölü korneositlerden oluşmaktadır [57, 60, 61]. Stratum korneum, korneosit hücrelerin lipit çift tabaka içine gömülü olduğu katmanlardan oluşmakta ve % 15 - 20 oranında su içermektedir [57]. Dış çevre ile derinin ara yüzünü oluşturan stratum korneum, istenmeyen maddelerin girişini ve suyun vücuttan çıkışını engelleyen bir bariyer görevi üstlenmektedir. Aynı zamanda,

güneşe veya kimyasallara maruziyet gibi dış faktörlerin neden olduğu deri hasarlarını iyileştirme kabiliyeti taşımaktadır [51, 58]. Özellikle bakteri ve virüsler dahil olmak üzere mikroorganizmaların deriye girişini engellemede önemli bir rol üstlenmektedir [62].

Keratinosit hücreleri; keratin ve filagrin üreterek derinin bariyer işlevini düzenlemek üzere farklılaşan epitel hücreleridir [46, 63, 64]. Keratinositler, deri yüzeyinden keratin pulları halinde dökülmeden önce yüzeye doğru hareket etmektedir. Şekil 2.2’de gösterildiği üzere, bu süreçte sitoplazmasında keratin biriktirerek sonunda keratin ile dolu hücrelere dönüşmektedir [63].



**Şekil 2.2** : İnsan keratinosit hücre hattı; (A) Işık mikrografları, (B) elektron mikrografları [65].

Apoptozun özel bir çeşidi olduğu düşünülen farklılaşmayı geçiren keratinosit hücreleri, deri üzerinde "keratinize" veya "kornifiye" olarak adlandırılan ölü bir tabaka oluşturmaktadır [64, 65]. Keratinosit hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması arasındaki denge, sağlıklı deri homeostazının korunması açısından kritik öneme sahiptir [63]. Düzensiz epidermal farklılaşma gerçekleşmesi halinde karşılaşılan olumsuz sonuçlardan biri de, deri geçirgenliğinin artması ile meydana gelen bariyer fonksiyonunun bozulmasıdır [66].

Epidermiste bulunan sitokinlerin ana kaynağı olmakla birlikte keratinositlerin çeşitli interlökinler (IL; örn:IL-1, IL-3, IL-6, IL-8), CSF (koloni uyarıcı faktör), tümör nekroz faktörü alfa (TNF- $\alpha$ ), dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF- $\alpha$ ), dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ) ve platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) salgıladıkları bildirilmiştir [67].

Keratinositlerin *in-vitro* büyümesi; farmakolojik ajanların etkileri, dermal-epidermal etkileşimler, doku antijenitesi ve karsinogenez gibi deriyi içeren normal biyolojik ve hastalık süreçlerinin incelenmesinde önemli bir araç olarak görülmektedir [68]. Epidermisin yenilenmesi ve yara kapanmasına yönelik klinik ihtiyaçlar neticesinde *in-vitro* keratinosit kültürleri üzerine yapılan araştırmalarda ilerleme kaydedilerek kültürlenmiş keratinositler kronik yaralarda bir tedavi seçeneği olarak kullanılmaya başlanmıştır [63, 69, 70].

### **2.2.2 Dermis**

Dermis; kolajen ve elastik bağ dokusundan oluşan destekleyici, sıkıştırılabilir ve elastik bir dokudur [57, 66]. Fibroblast hücreleri ve fibröz moleküller (elastin ve kolajen) bu deri tabakasının ana bileşenleridir [57]. Dermal-epidermal bağlantı unsurlarının sağlıklı bir şekilde oluşması, deri dengesinin korunması ve fonksiyonel bir epidermisin devamlılığı için fibroblastlar ve keratinositler arasındaki haberleşmenin önemli olduğu belirtilmiştir [66].

### **2.2.3 Hipodermis**

Subkutan doku olan hipodermis, derinin en derin tabakasıdır ve büyük oranda yağ dokusundan oluşmaktadır [71]. Dermisin altında yer alan hipodermis; termal düzenleme, yalıtım, enerji sağlama (besin deposu) ve mekanik yaralanmalardan korunmada önemli bir rol oynamaktadır. Adiposit olarak adlandırılan yağ hücreleri bu tabakada yer alan ana hücrelerdir [57].

## **2.3 Deriden Emilim ve Geçiş Mekanizmaları**

Deri, lokal ve sistemik etkiler için terapötik bileşenlerin uygulanması üzere ideal bir bölge sağlarken aynı zamanda bileşenlerin nüfuz etmesini önleyen zorlu bir bariyer de oluşturmaktadır [72]. Stratum korneum, deri geçirgenliği açısından incelendiğinde aşılması gereken ana bariyer niteliğindedir [48].

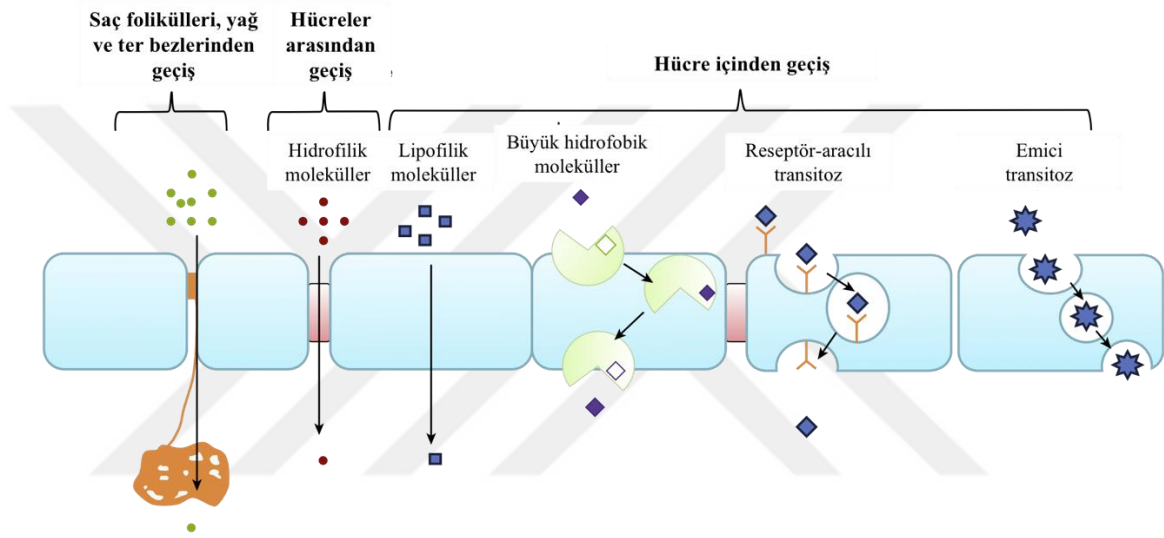
Perkütanöz ya da dermal emilim süreci, bileşiklerin deri üzerinden geçişini tanımlamakta ve üç adıma ayrılabilir:

Penetrasyon: bir maddenin belirli bir katmana veya yapıya girmesi, örneğin bir bileşiğin stratum korneuma girmesi.

Permeasyon: bir katmandan, ilk katmandan hem işlevsel hem de yapısal olarak farklı olan başka bir katmana nüfuz etme.

Rezorpsiyon: bir maddenin vasküler sisteme (lenf ve/veya kan damarı) alınması [57].

Şekil 2.3'teki üzere, ilaçlar pasif olarak epitel hücrelerinin hücre zarından (hücre içerisinden geçiş), hücreler arasındaki bağlantılardan (hücreler arası geçiş) ve taşıyıcı- aracılı olarak aktif veya kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla emilebilmektedir. P- glikoprotein gibi çeşitli taşıyıcılar, epitel enzimler ve reseptör aracılı endositoz da ilaçların deriden emiliminde rol alabilmektedir [73].



Şekil 2.3 : İlaçların deriden geçiş yolları [74].

Deri yüzeyine uygulanan bir formülasyondan etken maddenin salınması ve sistemik dolaşıma katılması aşağıdaki basamakları içeren kademeli bir süreçtir:

- Formülasyon içerisinde çözünme ve formülasyondan salım,
- Derinin dış tabakası stratum korneumda dağılım,
- Hücreler arası yol aracılığıyla stratum korneumdan difüzyon (hız sınırlayıcı adım),
- Stratum korneumdan sulu ve canlı epidermise dağılma,
- Canlı epidermis boyunca ve üst dermise doğru difüzyon,
- Yerel kılcıl damar ağına ve nihayetinde sistemik dolaşıma alınma [75].

## 2.4 Deriden Emilimi ve Geçişi Etkileyen Unsurlar

Topikal uygulanan ilaçların deriden emilim süreci; yaş, derinin fizyolojik durumu, deri sıcaklığı, uygulama alanı, temas süresi, uygulama sıklığı, deri hidrasyonu ve periferik dolaşım gibi bir dizi fiziksel ve biyolojik faktöre bağlıdır [76].

Bunlara ilave olarak partikül boyutu ve şekli, zeta potansiyeli, partikül boyutu dağılımı gibi faktörler de etken maddelerin nanotaşıyıcılar ile topikal uygulamasını ve emilimini etkilemektedir [74].

## 2.5 Deri İrritasyonu ve Mekanizması

İrritasyonu kapsayan çalışmaların temel amacı; ilaç, kozmetik, ev ürünleri, endüstriyel kimyasallar ve tarım ilaçları dahil olmak üzere çeşitli kimyasalların olası olumsuz etkilerine karşı insanları korumaktır [77]. Deri irritasyonu; kimyasallar, ilaçlar veya doğal ürünler de dahil olmak üzere çeşitli maddelerin deri üzerinde yol açtığı toksisiteyi, geri dönüşümlü lokal enflamatuar yanıtları, deri hücresi hasarını ve ölümünü kapsayan bir yan etkidir [78].

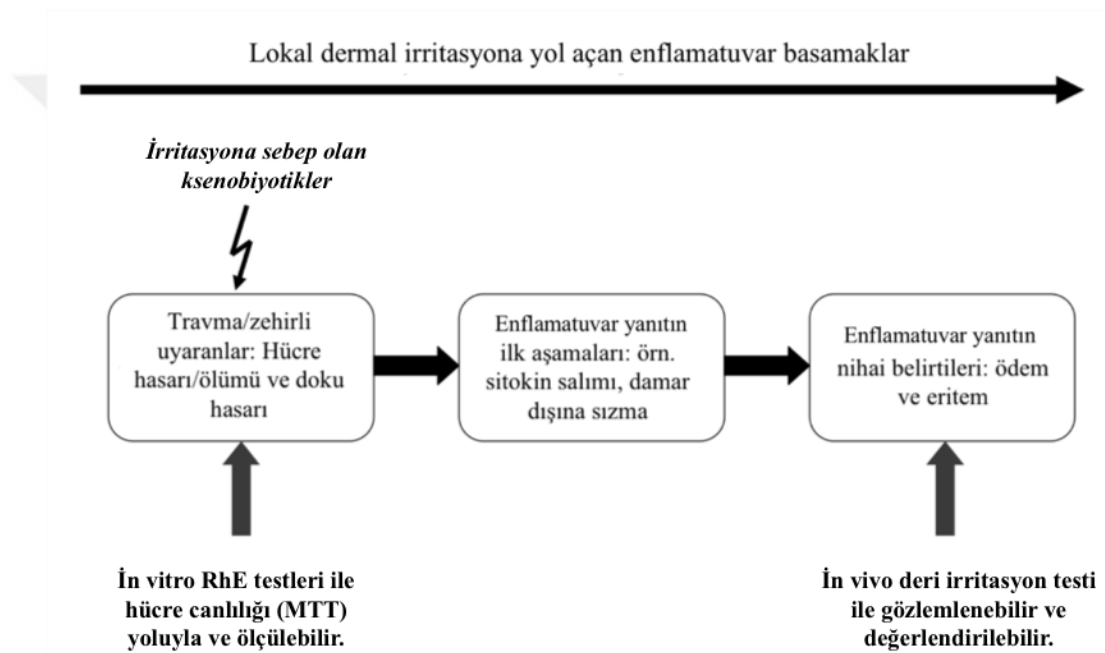
İrritasyon; ultraviyole B (UVB) ışınları, yüzey aktif maddeler, aşırı pH değerleri veya bazı kozmetik aktif maddelerin (retinoidler, alfa-hidroksi asitler) yüksek dozları gibi çeşitli çevresel uyaranlardan kaynaklanabilmektedir. Bu uyaranlar; deride farklı enflamatuar araçların oluşumunu tetikleyerek irritasyona (kızarıklık, şişme, kaşıntı, acı) yol açmaktadır [77, 79]. Yaygın olarak görülen deri reaksiyonları arasında dermatit, deri hassasiyeti ve kontakt ürtiker de yer almaktadır [80].

İnsan ve hayvan derisinde meydana gelen irritasyon, araşidonik asit metabolitleri ve sitokinlerin aracılık ettiği enflamatuar reaksiyon ile karakterizedir [46]. İrritasyona sebep olan bir maddeye maruziyeti takiben, birincil sitokinlerin (IL-1 $\alpha$  gibi) salımıyla lokal enflamatuar reaksiyon başlamaktadır. Ardından bu sitokinler, ikincil sitokin sentezini ve salımını uyarmaktadır. Artan sitokinler enflamatuar yolağı tetiklemekte ya da negatif geri bildirim yoluyla reaksiyonu baskılamaktadır [81].

Stratum korneuma girerek irritasyona neden olan maddeler, delipidasyona ve protein denatürasyonuna yol açmaktadır. Delipidasyon; lipit kompozisyonunun değiştiği, seçici geçirgenliğin ve bariyer fonksiyonunun bozulduğu bir süreci tanımlamaktadır. Deri bariyerinde hasarla sonuçlanan bu süreçler, transepidermal su kaybının artmasına

ve daha önemlisi maddenin epidermal katmanlara nüfuzunun artmasına yol açmaktadır [46, 82].

Ana hatlarıyla eritem ve ödem ile tezahür eden deri irritasyonu, kimyasalların stratum korneuma nüfuzuyla derinin alt katmanlarındaki hücelere zarar verdikleri bir sürecin sonucudur. Şekil 2.4'te şematize edildiği üzere, hasar gören hücelere enflamatuar sitokinler salgılamakta ya da dermisteki hücelere tarafından kan damarlarındaki endotel hücrelerin enflamatuar yolağı tetiklenmektedir. Endotel hücrelerin genişlemesi ve geçirgenliğinin artması, lokal kan akışının artması ve plazmanın kan damarlarından sızması ile eritem ve ödem oluşmaktadır [83, 84].



Şekil 2.4 : Lokal dermal irritasyona yol açan enflamatuar basamakların şematik gösterimi [85].

## 2.6 Biyoaktif Bileşenler

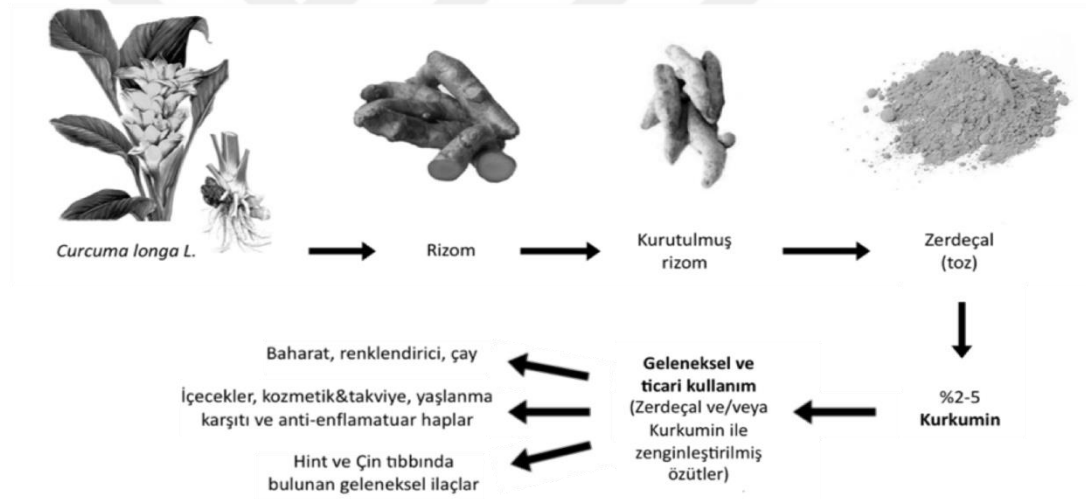
Biyoaktif bileşiklerin çeşitli hastalıklar ve hastalıkların önlenmesi üzere etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ancak suda çözünürlüklerinin ve biyoyararlanımlarının düşük olması, biyoaktiflerin gıda ve farmasötik formülasyonlara dahil edilmesini kısıtlamaktadır [86, 87].

Antioksidan, antikanser, antienflamatuar, antimikrobiyal ve yaşlanma karşıtı aktiviteleri neticesinde biyoaktifler ve fonksiyonel bir biyoaktif kaynağı olarak bitkiler dikkat çekmektedir [86, 87]. Öte yandan deride hassasiyete ve alerjik reaksiyona sebep

olabileceğinden farmasötik ürünlerdeki bitkisel bileşenlerin güvenliği, uygulama sırasında mevcut deri rahatsızlıklarının şiddetlenmesini önlemek adına değerlendirilmelidir [88].

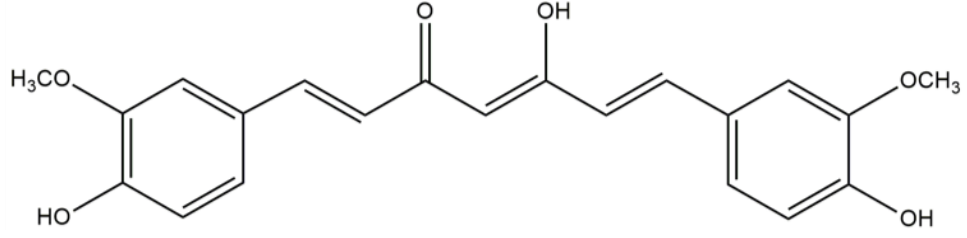
### 2.6.1 Kurkumin

Bir zerdeçal türü olan *Curcuma longa* bitkisinin etken maddesi Kurkumin, son yıllarda halk arasında artan bir popüleriteye sahip olmasının yanı sıra çeşitli terapötik etkileri sebebiyle bilim dünyasının da önemli bir araştırma ve odak noktası haline gelmiştir. Şekil 2.5'te yer aldığı üzere Kurkumin; zerdeçal baharatından elde edilmekte ve zerdeçal rizomu içerisinde % 2 – 5 arasında bir orana sahiptir. Antioksidan, nöroprotektif, antikanser, bağışıklık sistemini düzenleyici, antiinflamatuvar, antibakteriyel özelliklere sahip aromatik kokulu polifenolik bir bileşik ve sarı renkli bir pigmenttir [89-92].



**Şekil 2.5 :** *Curcuma longa*'dan zerdeçala ve Kurkumin'e: geleneksel ve ticari kullanımları [93].

Kurkumin'in IUPAC ismi (1E,6E)-7,7-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3,5-dion'dur. Kimyasal formülü  $C_{21}H_{20}O_6$ 'dır. Kimyasal yapısı ise Şekil 2.6'da verilmiştir [94].



**Şekil 2.6 :** Kurkumin'in kimyasal yapısı.

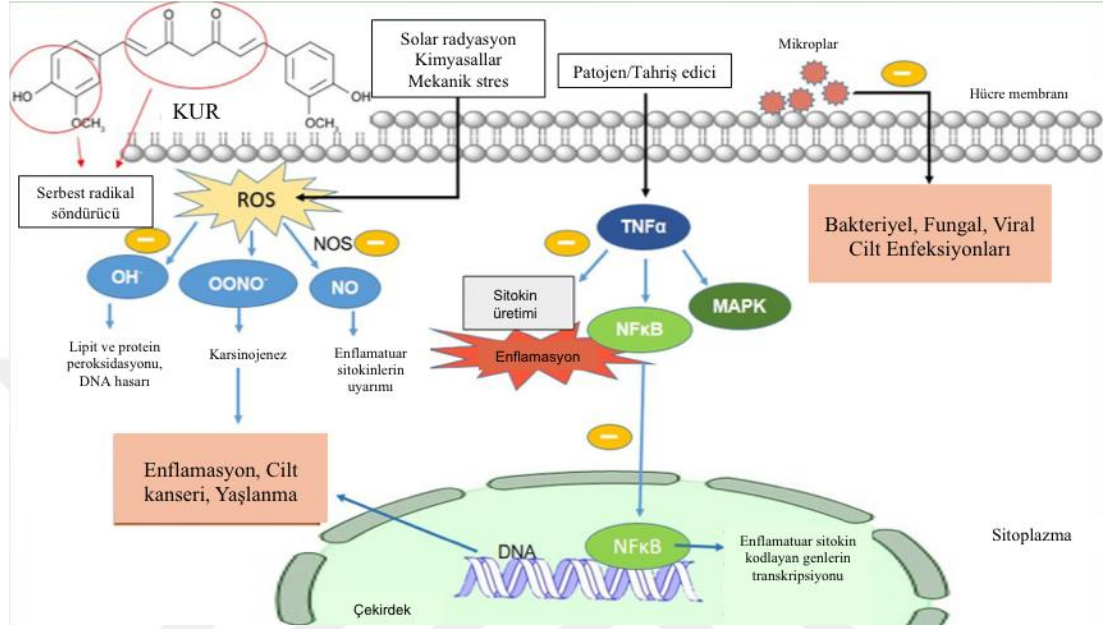
Molekül ağırlığı 368,37 g/mol, erime noktası ise 183 °C'dir [94, 95]. Kurkumin; hidrofobik bir polifenol olarak asidik ve nötr pH koşullarında suda çözünmüyor iken metanol, etanol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve asetonda çözünebilmektedir [94]. Organik çözücülerin çoğunda absorpsiyonu 408-430 nm dalga boyu aralığındadır [96]. Kimyasal olarak, keto-enol tautomerizmini oluşturan β-diketon aracılığıyla simetrik şekilde bağlanmış iki fenol içeren benzersiz bir konjuge yapıya sahiptir ve bu yapı Kurkumin'e ilginç fotofiziksel ve fotokimyasal özellikler kazandırmaktadır [94, 96]. Keto formunda daha kararlı iken çözeltilerde tamamen enol formunda bulunmaktadır [97].

Kurkumin'in; moleküler hedeflere (reseptör, enzim, kofaktör) bağlanıp çeşitli mekanizmalar üzerinden etki ederek hücrel sinyal yollarını ve gen ifadelerini düzenlediği bildirilmiştir. Preklinik ve klinik veriler ile Kurkumin'in basitten kroniğe pek çok deri hastalığı için terapötik etkinlik taşıdığı vurgulanmıştır [7].

Yapılan çalışmalar ile deri üzerinde antikanser, antioksidatif, antiinflamatuvar, apoptoz indükleyici, antianjiogenik, yaşlanma karşıtı, yara iyileştirici, antimikrobiyal, antibakteriyel olmak üzere terapötik aktiviteleri saptanmıştır [6, 90]. Ayrıca akne, alopesi, atopik dermatit, ultraviyole A (UVA) ve UVB ışınlarının deride yol açtığı yaşlanma, liken planus, pruritus, sedef, radyodermatit, vitiligo gibi deri hastalıklarının tedavilerinde kullanılmak üzere topikal formülasyonlara Kurkumin dahil edilmiştir [3].

Kurkumin; enflamasyonda rol alan sitokinlerin (IL-1, TNF-α) oluşumunu önleyerek enflamatuvar yanıtları kontrol etmekte, enflamasyon ve oksidasyon süreçlerinin temel nedeni olan enzim ifadesini düşürmekte, fibroblast göçünü, granülasyon dokusu gelişimini, kolajen birikimini, yeniden epitelizasyonu ve fibroblast proliferasyonunu artırarak dokunun yeniden yapılanmasını ve yara kapanmasını teşvik etmektedir [98]. Kurkumin; birçok deri hastalığında rol oynayan ve enflamasyona sebep olan genlerin düzenlenmesinde görevli olan IL'ler, tümör nekroz faktörü (TNF), nükleer faktör

kappa B (NF- $\kappa$ B) benzeri başlıca enflamatuar mediatörlerin ifadesini baskılamakta ve aşırı TNF- $\alpha$  üretimini baskılamaktadır [99]. Şekil 2.7’de gösterildiği üzere doğrudan TNF- $\alpha$  reseptör bağlanma bölgelerine bağlanarak NF- $\kappa$ B’nin TNF-aracılı aktivasyonunu bloke etmektedir [100].



**Şekil 2.7 :** Kurkumin’in çeşitli deri hastalıkları üzerine etki mekanizması [7].

Mukhopadhyay ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, iritasyon etkisini incelemek üzere akut ve kronik enflamasyon modellerinde enflamatuar ajanlarla birlikte enflamasyon bölgesine lokal olarak Kurkumin uygulanmış ve Kurkumin’in hem anti-enflamatuar hem de iritasyon yapıcı aktiviteleri birlikte görülmüştür [101].

Düşük konsantrasyonlarda Kurkumin'in insan deri hücrelerinde proteazomun uyarılması, keratinositlerin farklılaşmasının artması ve stres toleransının iyileşmesi gibi çeşitli uyarıcı etkileri gösterilmiştir [102]. 5 ve 10  $\mu$ M Kurkumin ile 48 saat muamele edilmesi fibroblast morfolojisini etkilemezken 25  $\mu$ M hücrelerin yuvarlaklaşmasına ve ölümüne yol açmış, 24 saatlik 25  $\mu$ M Kurkumin uygulaması ise hafif bir apoptoz tetikleyici etki göstermiştir [103]. Fibroblastların aksine insan dermal keratinositleri üzerinde Kurkumin'in koruyucu etkileri doza bağlı aktivite göstermiştir. 10  $\mu$ g/mL Kurkumin konsantrasyonu, keratinositler üzerinde hidrojen peroksit hasarına karşı etkin koruma sağlarken 5  $\mu$ g/mL orta düzeyde koruma, 25  $\mu$ g/mL ise hücreler üzerinde toksik etki göstermiştir [104].

Terapötik etkinliğine karşın düşük biyoyararlanıma, düşük deri emilimine, kimyasal kararsızlığa ve sulu çözeltilerde düşük çözünürlüğe sahip olması Kurkumin'in terapötik kullanımını büyük oranda sınırlandırmaktadır [105-107]. Nanopartiküller, lipozom, misel ve fosfolipit kompleksleri ile hazırlanan formülasyonların; Kurkumin'in membran bariyerlerinden geçirgenliğini, kan dolaşımında kalış süresini ve çözünürlüğünü artırması beklenmektedir [107].

Ayrıca ışığa maruziyeti sonrasında antioksidan ve antienflamatuar aktivitelerinde azalma görülürken oksidatif stresin uyarımı, apoptoz-nekroz, hücre hasarı ve hücre ölümü gibi yan etkilere de sebep olmaktadır. İlave olarak, saf Kurkumin'in fototoksosite ve fotoduyarlılık etkileri tartışılmaktadır [90, 108].

Dezavantajlarını ortadan kaldırmak adına lipozom–fosfolipit, nanojel, mono-olein sulu dispersiyon, nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT), nanoemülsiyon, polimerik misel ve polimerik nanopartikül, veziküler sistemler dahil olmak üzere çeşitli enkapsüle edilmiş Kurkumin formülasyonları araştırılmıştır. Bu formülasyonlar ile Kurkumin'in çözünürlüğünün ve biyoyararlanımının artmış olduğu gözlemlenmiştir [90, 109].

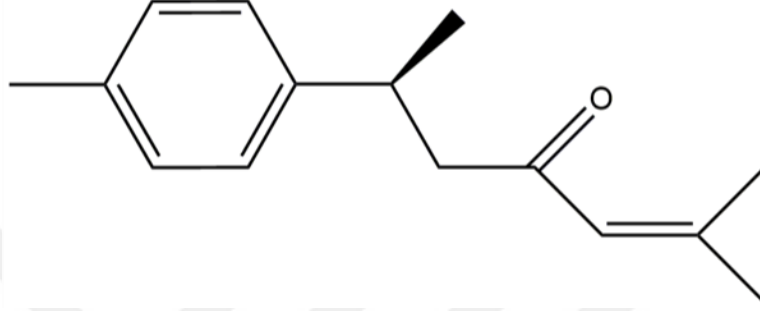
Enkapsüle formülasyonların devamlı ve az miktarda Kurkumin salımını mümkün kılması, Kurkumin'i oksidasyon riskinden koruyarak uzun süreli aktivite ve stabilite sağlamıştır. Bir çalışmada amorf NanoCur kullanılarak Kurkumin'in geçirgenlik oranı, ilaç salım parametreleri, raf ömrü ve antienflamatuar aktivitesi iyileştirilmiştir. Sonrasında ise su ile titrasyon metoduyla nanoemülsiyon içerisine katılarak hazırlanan formülasyon topikal ilaç taşınımı açısından değerlendirilmiştir [110].

Bir diğer çalışmada, topikal Kurkumin uygulaması için iyileştirilmiş çözünürlük ve deri nüfuzu sağlaması adına taşıyıcı olarak emu yağı kullanılmış ve nihai formülasyon sinerjistik antienflamatuar etki göstermiştir [111]. Kurkumin içeren taşıyıcı sistem içerisindeki yağ yüzdesinin artırılması uygulama sonrasında meydana gelebilecek eritem ve ödem riskini azaltabilmektedir [112].

Yapılan bir çalışmada yükleme kapasiteleriyle ilişkili olarak biyoyararlanımda Kurkumin yüklü KLN ile otuz dokuz, nanoemülsiyon ile dokuz ve lipozom ile ise beş kat artış sağlandığı görülmüştür [87].

## 2.6.2 Turmeron

Turmeron, *Curcuma longa* uçucu yağının ana bileşenidir [17]. Zerdeçala özgün kokusunu veren başlıca maddelerden biridir [113]. Turmeron'un topikal olarak antioksidan, antienflamatuar, antikanser, antipsoriyatik etkiler ortaya koyduğu gösterilmiştir [13-16]. Şekil 2.8'de Aromatik Turmeron'un moleküler yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.8 : Turmeron'un yapısı.

Yapılan bir çalışmada, İmikuimod ile uyarılarak sedef modeli oluşturulmuş fareye Turmeron uygulanmıştır. Turmeron'un; epidermisteki T hücrelerinin göçünü inhibe etmek, NF- $\kappa$ B ile siklooksijenaz-2 (COX-2) ifadelerini azaltmak, TNF- $\alpha$  ve IL-6 seviyelerini düşürmek, IL-17, IL-22 ve IL-23 ifadelerini azaltmak suretiyle deri enflamasyonunu hafiflettiği görülmüştür. Çalışmanın sonucunda ise Turmeron'un antienflamatuar aktive ortaya koyduğu ve sedef gibi enflamatuar deri hastalıklarının tedavisi açısından gelecek vadeden bir aday molekül olduğu vurgulanmıştır [17].

Bir başka çalışmada Turmeron, doza bağlı olarak insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) Hedgehog sinyal yolağını etkisiz hale getirmiştir. Hücrelerin proliferasyon yeteneğini baskılamış, apoptozu kolaylaştırmış ve TNF- $\alpha$ -aracılı IL-1 $\beta$ , IL-6, ve IL-8 üretimini azaltarak enflamatuar sitokin ifadesini azaltmıştır [15].

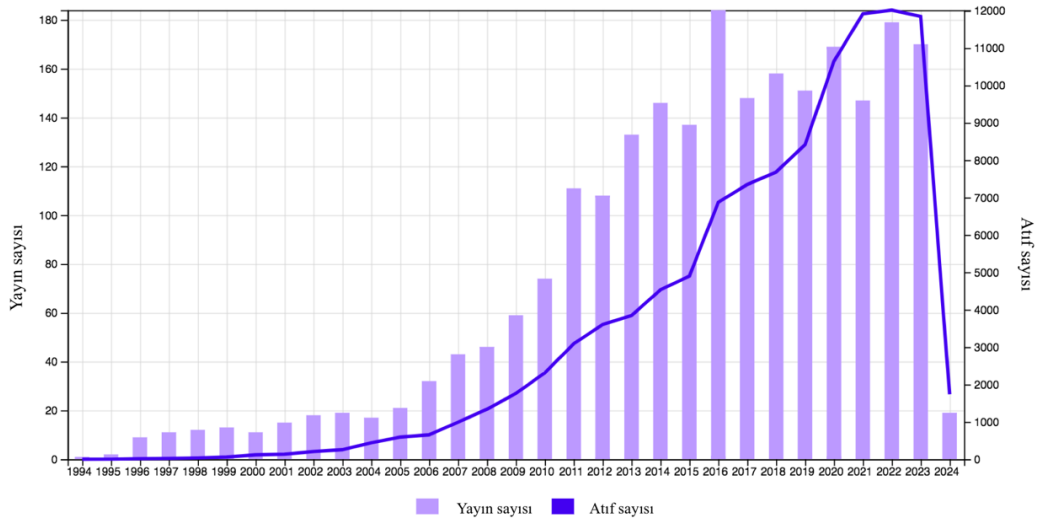
## 2.7 Nanotaşıyıcı Sistemler

Nanotaşıyıcıların kullanıldığı nanoteknoloji tabanlı stratejiler, terapötik ajanların taşınmasına dair geleneksel tedavilerde karşılaşılan engelleri aşmak üzere gelecek vaat etmektedir [114]. Stabilitesi, biyoyararlanımı ve çözünürlüğü düşük olmasının yanı sıra irritasyona sebep olan biyoaktiflerin deriden emilimini arttırmak ve topikal formülasyonlarında karşılaşılan zorlukları aşarak terapötik aktivitelerinden

yararlanmak adına lipozom, niozom, nano ya da mikroemülsiyon, KLN, NLT ve polimerik nanopartikül gibi nanotaşıyıcı sistemler başarılı birer yaklaşım olarak kullanılmaktadır [87, 115-117].

## 2.8 Katı Lipit Nanopartikül

1991 yılında, diğer kolloidal taşıyıcıların avantajlarını bir araya getirmek fakat dezavantajlarını aşmak üzere KLN tanıtılmıştır. KLN'ler; emülsiyon, lipozom, polimerik mikropartikül ve nanopartiküller gibi geleneksel kolloidal sistemlere alternatif bir taşıyıcı sistem olarak kabul edilmektedir. Şekil 1.1'de yer alan grafikte görüldüğü üzere atıf ve yayın sayıları göz önünde bulundurulduğunda son yıllarda KLN'ler giderek artan bir ilgi görmektedir [118].



**Şekil 2.9** : 25 Mart 2024 tarihli “katı lipit nanopartiküller” anahtar kelimeleriyle WoS portalında yapılan aramada elde edilen son 30 yıla ait yayın ve atıf sayısı verileri.

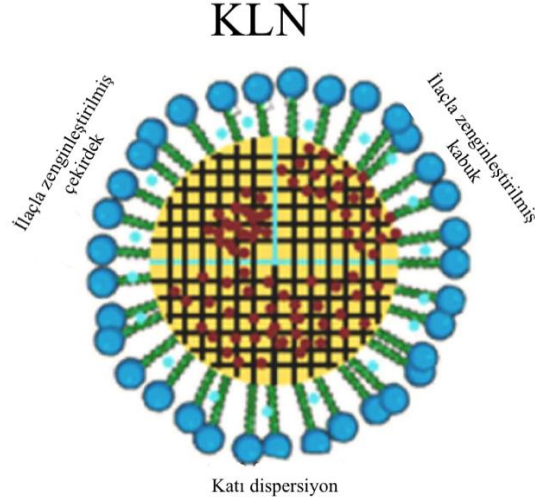
KLN, emülsiyon yapısında yer alan sıvı haldeki lipitin katı bir lipit ile değiştirilmesiyle meydana gelmektedir. Seçilen bu lipitler, oda sıcaklığıyla birlikte vücut sıcaklığında da katı olma özelliğini muhafaza etmektedir [119]. KLN; toksik olmayan amfifilik yüzey aktif maddelerle kaplı bir dış kabuk ile yüksek erime noktasına sahip, fizyolojik ve biyouyumlu lipitlerden oluşan katı bir çekirdekte meydana gelmektedir [120]. Tamamen kristalize olmuş ve biyoaktif bileşenlerin lipit matriksin bir parçası olduğu son derece düzenli kristal yapıya sahip lipit damlacıkları ihtiva etmektedir [121].

KLN'ler, eriyen lipit molekülleri ile etken maddenin bir araya getirilerek emülgatör içeren sulu faz içerisinde dağıtılması suretiyle oluşan su içinde yağ (Y/S) nanoemülsiyonlarından meydana gelmektedir [122]. Yapı olarak, sulu bir ortamda yüzey aktif maddeler tarafından kararlı hale getirilen 10-1000 nm boyut aralığına sahip katı lipit karışımından oluşmaktadır ve küresel bir morfolojiye sahiptir [123, 124]. KLN'ler, partikül boyutlarının küçük olması sebebi ile stratum korneum ile yakın temas sağlamakta ve dolayısıyla canlı deriye nüfuz eden enkapsüle edilmiş etken madde miktarını arttırmaktadır [125].

Doğası gereği KLN, hidrofobik çekirdek ve hidrofilik dış katman içermesi nedeniyle hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıdaki maddelerin enkapsülasyonunu mümkün hale getirebilmektedir [126]. Lipozoma ve emülsiyona kıyasla daha karardır [127]. Fiziksel olarak daha stabil bir yapıya sahiptir. İlaçların bozunması, biyoyumluluk ve bozunabilirlik kaynaklı olası sorunların önüne geçmektedir. Fosfolipitlere ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlere kıyasla ise daha uygun maliyetli olup yüksek ilaç yükleme kapasitesine ve birkaç haftaya kadar sürebilen yavaş, kontrollü ilaç salımına olanak sağlamaktadır [127, 128].

Bahsi geçen üstünlüklere ilave olarak uygulama spektrumunun (dermal, intravenöz, oral) geniş olması, üretiminde organik çözücülerden kaçınılması, biyoyumlu ve fizyolojik lipitlerin katı matriks bileşimi dolayısıyla toksisite tehlikesinin düşük olması, endüstriyel ölçekte formülasyon üretilebilmesi ve sterilize edilebilmesi gibi üstünlükleri kapsıyor olması bir ilaç taşıyıcı sistem olarak KLN'nin potansiyelini vurgulamaktadır [129, 130].

KLN; katı dispersiyon, ilaçla zenginleştirilmiş çekirdek ve ilaçla zenginleştirilmiş kabuk olmak üzere Şekil 2.10'da gösterildiği üzere üç tip morfolojik yapıya sahiptir. Genellikle katı çekirdek dispersiyonu, yoğun hidrofobik çekirdek ve daha sonra yüzey aktif madde tabakası ile çevrili katı lipit matriks içinde çözünmüş veya dağılmış ilacı içermektedir. Bununla birlikte çekirdekteki katı lipit yeniden kristalleşerek ilacın dış kabuğa göç etmesine yol açtığında, ilaçla zenginleştirilmiş kabuk morfolojisi meydana gelmektedir. Bunun aksine ilaç, katı lipitin yeniden kristalleşmesinden önce çekirdekte birikebilmekte ve ilaçla zenginleştirilmiş çekirdek modelinde olduğu gibi etrafı katı lipit kristali ile çevrelenebilmektedir [131].



Şekil 2.10 : KLN'nin şematik morfolojileri [131].

### 2.8.1 Katı lipit nanopartikül bileşenleri

KLN; temel olarak katı lipit (balmumu, karnauba mumu, trigliseritler), doymuş yağlar (Witepsol®, gliseril monostearat, gliseril behenat, gliseril palmitostearat, setil palmitat, stearik asit, palmitik asit, dekanolik asit, behenik asit), yüzey etken madde (kaprilil/kapril glukozit, soya lesitini, yumurta lesitini, fosfotidilkolin, poloksamer, sodyum kolat, sodyum glikolat, taurokolik asit sodyum tuzu, taurodeoksikolik asit sodyum tuzu, bütanol, butirik asit) ve sudan meydana gelmektedir [132, 133].

### 2.8.2 Katı lipit nanopartikül hazırlanırken kullanılan yöntemler

KLN hazırlama ve üretim aşamasında kullanılan çeşitli yöntemler aşağıda sıralanmıştır [134]. Yüksek devirli homojenizasyon, mikroemülsiyon ve ultrasonikasyon yöntemleri sıklıkla kullanılıyor olup homojenizasyon ve ultrasonikasyon esnasında KLN'lerin partikül boyutunu etkileyen faktörler arasında lipit ve emülgatör türleri, konsantrasyonları, homojenizasyon ve/veya sonikasyon süreleri mevcuttur [135].

- Yüksek basınçlı homojenizasyon
- Mikroemülsiyon bazlı yöntem
- Çözücü emülsifikasyon-buharlaştırma
- Çözücü emülsifikasyon-difüzyon
- Eriyik dispersiyon tekniği

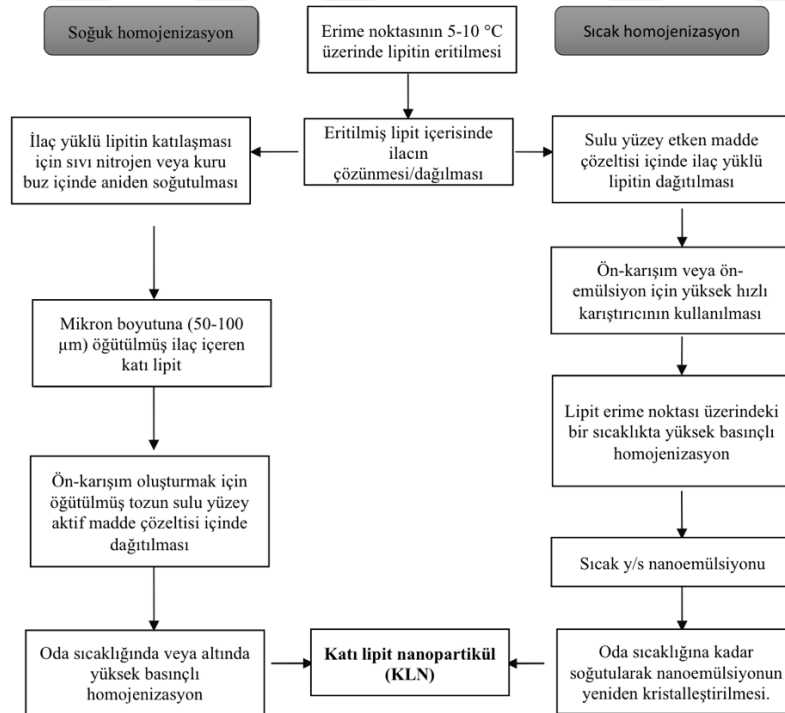
- Yüksek devirli homojenizasyon
- Membran kontaktör yöntemi
- Süperkritik sıvı teknolojisi

Yukarıdaki yöntemler arasından sıklıkla kullanılanlar aşağıda açıklanmaktadır.

### 2.8.2.1 Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi

KLN üretiminde en çok tercih edilen yöntemdir. Eritilmiş lipit çözeltisi yüksek basınçla (100-200 bar) birkaç mikronluk dar bir aralıktan yüksek hızda itilmekte ve hızlı basınç düşüşü meydana geldikten sonra karışım katı yüzeye çarpması neticesinde daha fazla parçalanarak nihayetinde homojenize bir şekilde sistemden boşaltılmaktadır. Dolayısıyla, partiküllerin mikron altı boyuta kadar parçalanmasına neden olan kuvvetler kaviteasyon ve kayma gerilimidir [134].

Bu yöntem, Şekil 2.11'deki üzere sıcak ve soğuk homojenizasyon olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Isıya duyarlı ilaçların dahil edilmesi veya ilaç enkapsülasyonunun artırılması için alternatif olarak soğuk homojenizasyon seçeneğinden istifade edilebilmektedir [136].



Şekil 2.11 : Sıcak ve soğuk homojenizasyon yöntemleriyle KLN hazırlama [134].

### **2.8.2.2 Mikroemülsiyon bazlı yöntem**

İlk olarak, katı lipitin erime noktası üzerindeki bir sıcaklıkta birincil mikroemülsiyon hazırlanmaktadır. Ardından, büyük miktarda soğuk dispersiyon ortamına dökülmekte veya enjekte edilmektedir. Bu adımda, önceden oluşmuş sıcak mikroemülsiyon damlacıkları hızla birbirinden uzaklaşmakta ve soğuduktan sonra kristalleşerek nanometre boyutundaki katı lipid partikülleri halini almaktadır [137]. Bu yöntemin prensibi, Y/S mikroemülsiyonunun büyük miktarda soğuk suya eklenerek lipid fazın KLN partiküllerini oluşturacak şekilde çökeltilmesine dayanmaktadır [138].

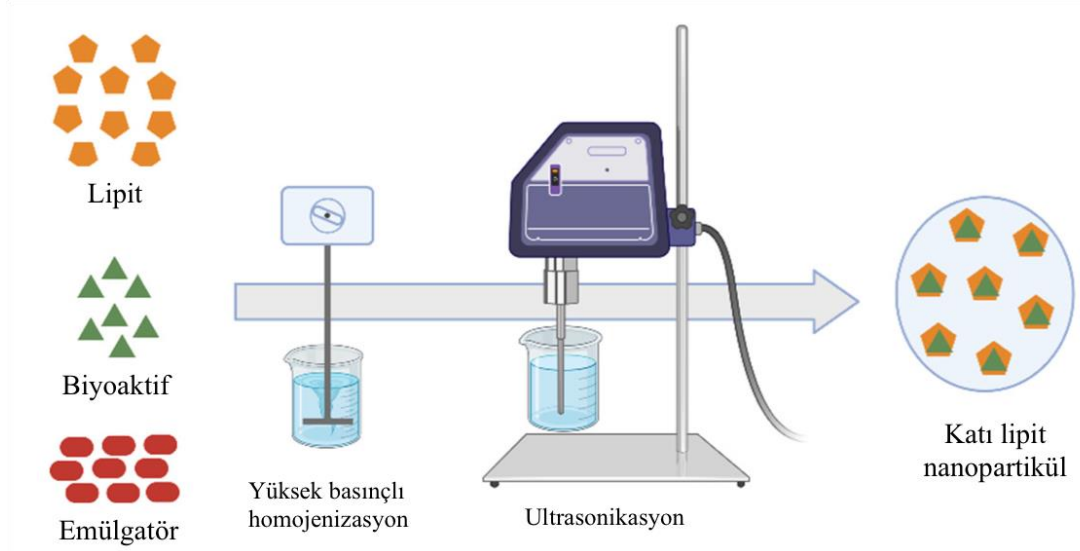
### **2.8.2.3 Çözücü emülsifikasyon-buharlaştırma yöntemi**

Geçici bir Y/S emülsiyonunun suya aktarılmasının ardından, organik çözücü (su ile karışmayan) içerisinde çözülmüş ilacın organik çözücünün damlacıklardan sürekli faza difüzyonuyla anında katılaşmasına dayanmaktadır. Ancak bu yöntemle hazırlanan KLN'ler büyük partikül çapı ve geniş boyut dağılımı sergilemektedir [139].

### **2.8.2.4 Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi**

Zaman içerisinde gerçekleşen partikül boyutunun büyümesi, formülasyonun fiziksel olarak kararsızlığına ve geniş partikül boyutu dağılımına yol açmaktadır. Bu husus büyük bir sorun teşkil ettiğinden, kararlı bir formülasyon oluşturmak üzere yüksek basınçlı homojenizasyon ve ultrasonikasyon birlikte kullanılarak çalışmalar yürütülmüştür [140].

Yöntem, lipitin (etken madde ile) erime noktasının 5-10°C üzerinde eritilmesini takiben emülsiyon oluşumu için yüksek hızda karıştırma altında aynı sıcaklıktaki yüzey aktif madde içeren sulu fazda dağıtılmasını içermektedir. Daha sonra, damlacık boyutunu küçültmek için formülasyon Şekil 2.12'deki üzere sonikasyona tabi tutulmakta ve nanopartikül dispersiyonunu oluşturmak için kademeli olarak soğutulmaktadır [133].



**Şekil 2.12 :** Yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile KLN hazırlama basamakları [141].

Nanopartikül eldesinde ultrasonikasyonun kullanımı, uzun sonikasyon süreleri gerektirdiğinden bu durum probdan nanopartiküllere metal bulaşı riskini arttırmaktadır [142]. Bu sebeple, ultrasonikasyon süreleri mümkün olduğunca kısa tutulmalıdır.

### 2.8.3 Katı lipit nanopartiküllerin stabilitesi

KLN'nin fiziksel ve kimyasal stabilitesi, süspansiyonun homojen kalma kabiliyeti ve kristal matriksin yeniden kristallemeye direnme kabiliyeti olmak üzere iki faktörle ilişkilidir. Süspansiyonun bozulmasına yol açan süreçler; flokülasyon, çökeltme, kremleşme ve birleşme gibi birçok diğer dispersiyonda görülen tipik kararsızlıkları kapsamaktadır [143].

KLN'lerin stabilitesini belirleyen faktörler arasında ışık, sıcaklık, ambalaj malzemesi ve depolama koşulları yer almaktadır. Daha az kararlı olan bazı sistemlerde, yüzey aktif maddelerin yapısına ve bileşimine bağlı olmakla birlikte depolama koşullarının ve ambalaj maddesinden de etkili olduğu düşünülen jelleşme rapor edilmiştir [144]. Hidrolize duyarlı ilaçlar içeren formülasyonlarda kimyasal stabilite önem teşkil ettiğinden liyofilizasyona tabi tutulmuş (dondurularak kurutulmuş) bir KLN formülasyonu arzu edilmektedir. Dondurulma hızı, yeniden dağılım yöntemi gibi parametreler optimize edilerek liyofilizasyon sırasında meydana gelebilecek partikül boyutu değişimleri en aza indirilebilmektedir [145].

#### **2.8.4 Katı lipit nanopartiküllerin karakterizasyonu**

Schwarz ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışmada; geliştirilen KLN'lerin karakterizasyonu için ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), partikül yükleri için ise zeta potansiyeli parametreleri incelenmiştir [146].

##### **2.8.4.1 Partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımı**

Partikül boyutu, KLN'nin hedeflenen özelliklerini değerlendirmek üzere kritik bir parametredir. Yaygın olarak kullanılan partikül boyutu analiz teknikleri arasında lazer difraksiyon, dinamik ışık saçılımı, coulter sayımı, taramalı iyon oklüzyon algılama, akış alanı fraksiyonlaması yer almaktadır [147]. PDI değeri; monodispers bir dağılım için 0'1, geniş bir dağılım için ise 0.5'ten büyük bir değeri göstermektedir [146].

##### **2.8.4.2 Partikül şekli ve morfolojisi**

KLN'ler genellikle küresel şekle sahiptir ve bir yüzey aktif maddenin oluşturduğu arayüzey bölgesi tarafından sabitlenmiş bir katı lipit çekirdek ihtiva etmektedir [148].

##### **2.8.4.3 Zeta potansiyeli**

Zeta potansiyeli, partiküller arasındaki elektrostatik itmenin ve elektroforetik hareketliliğin bir ölçütüdür [149]. Bir partikülün sahip olduğu zeta potansiyeli, partikülün belirli bir ortamda elde ettiği toplam yüküdür. Zeta potansiyelindeki azalma, fiziksel stabilitedeki azalma ile ilişkilidir. Mükemmel bir fiziksel stabilite için -60 mV'den büyük, iyi bir fiziksel stabilite için ise -30 mV'den büyük bir zeta potansiyeli değerinin gerekliliği belirtilmiştir [150].

##### **2.8.4.4 Etken madde miktar tayini ve enkapsülasyon etkinliği**

Enkapsülasyon etkinliği (EE), nihai olarak nanopartikül içerisinde hapsedilen ilaç miktarını ifade etmektedir ve elde edilen EE değeri de enkapsülasyon işleminin verimliliğini ifade etmektedir [147].

KLN'lerin karakterizasyonu için ana parametrelerden biri olan EE, karıştırma hızı ve süresinin yanı sıra yüzey aktif madde ve ilaç konsantrasyonlarından etkilenmektedir. Lipitin ve yüzey aktif maddenin yapısı ile konsantrasyonu, optimum EE'ye ulaşmak üzere etkin bir rol oynamaktadır. İlacın lipofilik özelliğinin ve ilaç ile lipit arasındaki uyumun yüksek olması da EE yüzdesini artırabilmektedir [151].

EE'nin objektif bir şekilde değerlendirilmesi adına nanopartiküllerin dış fazdan ayrılması gerekmektedir ve bu işlem santrifüj yoluyla gerçekleştirilebilmektedir [152].

İlacın lipite yüklenme miktarını ve EE değerini belirleyen faktörler aşağıda sıralanmıştır:

1. İlacın eritilmiş lipit içindeki çözünürlüğü,
2. İlaç eriyiği ve lipit eriyiğinin karışabilirliği,
3. Katı lipit matriksin kimyasal ve fiziksel yapısı,
4. Lipit maddenin polimorf hali [153].

#### **2.8.4.5 İn-vitro etken madde salımı**

*In-vitro* ilaç salım çalışmaları, dozaj formunun *in-vivo* davranışını anlamak üzere önem teşkil etmektedir. Ayrıca bu çalışmalar, dispersiyon sistemlerinin salım profillerinin değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır [154]. KLN'ler, ilk olarak suda az çözünen maddelerin koloidal lipit taşıyıcılardan kontrollü salımını sağlamak amacıyla geliştirilmiştir [155]. KLN, biyoaktiflerin lipit matriksin bir parçası olduğu tamamen kristalize olmuş düzenli yapıya sahip lipit damlacıklarından meydana gelmektedir. Biyoaktif bileşenin hareketliliği, lipit matriksin fiziksel özellikleri kontrol edilerek ayarlanabildiğinden çok daha düşük bir difüzyon hızı sağlanabilmektedir. Bu nedenle KLN uzun süreli salımı mümkün hale getirmektedir [156].

#### **2.8.5 Katı lipit nanopartiküllerin uygulama alanları**

KLN'ler nanotaşıyıcı sistem olarak oral, dermal, oküler ve parenteral uygulamalarda yararlanılmak üzere kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır [157].

Son araştırmalar ile; lipofilik nutrasötikler için pratik bir taşıyıcı sistem, stabil, biyoyararlanımı yüksek ve sulu ortamlarda dağılabilir olmaları nedeniyle KLN'lerin ilaç ve gıda sektörlerinde kullanımı artmıştır. Bu bağlamda, birçok biyoaktif KLN formülasyonlarına yüklenerek test edilmiştir. Örneğin; % 50 kakao yağı içinde beta-karoten, stearik asit içinde resveratrol, karnauba mumu içinde rosmarinik asit, tristearin, trimiristin ve gliseril monostearat içinde kurkuminoidler ve allantoin, gliseril monostearat ve Precirol® ATO 5 içinde *Zataria multiflora* uçucu yağı, hidrojene soya fasülyesi yağına yüklenmiş nane uçucu yağı [158].

Kimyasal olarak kararsız özellikteki aktiflerin katı lipit matrisine hapsedilmesi ile KLN bu maddelerin bozunmasına karşı koruyucu etkinlik sağlamaktadır. Bu bağlamda KLN'lerin özellikle antioksidanların, güneş koruyucuların, kararsız kozmetik bileşenlerin topikal uygulamaları için avantajlı olduğu düşünülmektedir [159]. Deri üzerinde film tabakası oluşturarak örtücü-koruyucu (oklüzif) etkilerinin nemliliği arttırmaları, kırıksıklıkları azaltmaları, bileşiklerin deri katmanlarına daha fazla nüfuz etmesini veya belirli bir yerde konumlanmasını mümkün kılmaları, topikal uygulama ile aktif bileşiklerin veya bozunma ürünlerinin istenmeyen renklerini örterek deri üzerinde beyaz pigment etkisi oluşturmaları KLN'lerin topikal uygulamalarda sağladıkları üstünlükler arasındadır [160, 161].

Kolloidal karakterleri (100 ile 500 nm arasında partikül boyutu), partiküllerin katı hali, partikül matrisini oluşturan fizyolojik lipitlerin yanı sıra partiküllerin kararlılığında rol alan ve vücut tarafından iyi tolere edilen yüzey aktif maddelerin mevcudiyeti KLN'leri deri hastalıklarının tedavisinde nanoboyutlu diğer sistemlere nazaran avantajlı bir seçenek haline getirmektedir. Deri yüzeyi ile temas eden KLN matrisinin çözünerek yapısındaki lipitlerin deri lipitleri ile etkileşmesi; etken maddenin deriden nüfuzunu iyileştirmektedir. Bu etkileşim, KLN'nin lipit yapısı ile nano boyuta sahip olması sebebiyle mümkün hale gelmektedir [162, 163].

## **2.9 Kalite Tasarım**

Tasarım yoluyla kalite (QbD); önceden tanımlanmış hedeflerle başlayan, ürün ve ürüne giden süreç hakkında bilgi edinmek ve nihayetinde süreçlerin kontrolünü sağlamak için bilimle birlikte risk yönetimi yaklaşımlarını kullanarak ilaç geliştirmeye yönelik sistematik bir yaklaşımdır [164]. QbD ilkeleri, her sektörde ürün ve süreç kalitesini geliştirmek üzere kullanılmaktadır [165]. Önceden tanımlanmış kalite özelliklerine sahip, başarılı ürün geliştirmeyi sağlamak amacıyla kritik ürün ve süreç parametrelerini derinlemesine kavramanın gerekliliğini vurgulamaktadır [166].

QbD, yöntem için bir hedefin tanımlanmasını zorunlu kılmakta ve en iyi yöntem başarısını elde etmek üzere alternatif yöntemlerin sistematik bir şekilde kapsamlı olarak değerlendirilmesini ve araştırılmasını vurgulamaktadır [164].

Süreç analiz teknolojileri (PAT); “nihai ürün kalitesini sağlamak amacıyla, ham ve işlem aşamasındaki malzeme ve süreçlerin kritik kalite ve performans özelliklerinin

zamanında (yani işlem sırasında) ölçülmesi yoluyla üretimin tasarlanması, analiz edilmesi ve kontrol edilmesine yönelik bir sistem” olarak tanımlanmıştır. PAT'ın amacı, mevcut ilaç kalite sistemiyle tutarlı üretim sürecini anlamayı ve kontrol etmeyi geliştirmektir: [167].

### **2.9.1 İlaçta Tasarım Yoluyla Kalite**

İlaçların geliştirilmesinde QbD; kritik kalite özellikleri (CQAs), deneysel tasarım (DoE), risk değerlendirmesi ve süreç analiz teknolojileri (PAT) gibi araçların kullanımını kapsamaktadır. Kalite, sadece son ürünün test edilmesiyle belirlenmemekle birlikte kritik kalite özellikleri hastanın güvenliğini ve ürünün tesirini etkilediği için kontrol edilmesi gereken parametrelerdir [166].

QbD için ürün ve süreci içeren bilgi tabanı; hammaddelerdeki değişkenliğin, süreç ile ürünün kritik kalite özellikleri (CQAs) arasındaki ve CQA'lar ile ürünün klinik özellikleri arasındaki ilişkinin anlaşılmasını gerektirmektedir. QbD; ilacın geliştirilmesi süresince daha bilimsel, risk temelli, bütünsel ve proaktif bir yaklaşıma doğru ilerlemenin yolu haline gelmiştir [167]. QbD; ilacın tasarlanması, geliştirilmesi ve yüksek kaliteli ilaç ürünlerinin üretilmesine katkıda bulunma hedefi taşımaktadır [165]. QbD'nin avantajları şu şekilde özetlenebilmektedir:

- Hastanın güvenliği ve ürün etkinliğine odaklanmaktadır.
- Farmasötik süreç ve yöntemlerin bilimsel olarak anlaşılmasını sağlamaktadır.
- Ürün tasarımı ve süreç geliştirmeyi kapsamaktadır.
- Bilimsel temelli risk değerlendirmesi yapmaktadır.
- Kritik kalite özellikleri belirlenerek bunların nihai ürün kalitesi üzerindeki etkisi analiz edilmektedir.
- Güvenilir bir yöntem veya süreç sunmaktadır [165].

### **2.9.2 Deneysel Tasarım**

DoE, bir süreci ve çıktısını etkileyen faktörler arasındaki ilişkileri belirlemek üzere tasarlanmış bir yöntemdir [168].

Özellikle ilaç ve biyofarmasötikleri kapsayan sektörlerde, birçok farklı süreç için veriye dayalı modeller geliştirmek elzemdir. Bu da genellikle DoE metodolojisine

eşlik eden bir modelleme yaklaşımı olan YYM kullanılarak gerçekleştirilmektedir [169]. YYM; bir yanıtı etkileyen kritik faktörler belirlendikten sonra yanıt yüzeyi modellenmesi kullanılarak bir hedefe ulaşmak, bir yanıtı en yüksek veya en düşük düzeye getirmek, varyasyonu azaltmak, yanıtları kontrol ederek süreç parametrelerini geliştirmek, iyileştirmek, optimize etmek ve süreci güvenilir hale getirmek gibi çoklu hedeflere ulaşmak amacıyla kullanılmaktadır [170, 171]. YYM; CCD ve Box-Behnken tasarımı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır [168].

Optimizasyon ve mümkün olan en iyi sonucu bulma sürecinde, CCD olarak adlandırılan bir DoE türü ortaya çıkmıştır. CCD, çeşitli deneysel tasarımlardan elde edilen sonuçlara ve ampirik modellere dayanarak mantıksal olarak düşünme ve çok değişkenli analizler yapmak üzere yol göstermektedir [172]. CCD, birinci dereceden bir modele uyum sağlamak için birinci dereceden bir tasarımla başlayarak ardından daha büyük ikinci dereceden modele uyum sağlamak adına tasarım noktalarının eklenmesiyle YYM'nin aşamalı yapısına uygun bir şekilde geliştirilmiştir [173].

## **2.10 Deri İritasyonunun Belirlenmesi**

Bir test maddesinin deri iritasyonuna yol açabilme ihtimali güvenlik prosedürleri çerçevesinde önemli bir konudur. Maddelerin beyanı, üretimi, taşınması veya pazarlanması için iritasyon potansiyelinin değerlendirilmesi toksikolojik rutin değerlendirmenin bir parçası olup ve bu değerlendirmenin sonucu yasal makamlar tarafından da talep edilmektedir [174, 175].

OECD TG 404 kılavuzunca maddelerin risk sınıflandırılması ve tehlike bildirimleri, sebep oldukları eritemin ve ödemin Draize puanlarına dönüştürülmesi ve bu puanların baz alınması ile gerçekleştirilmektedir [176, 177].

İritasyonun belirlenmesinde geleneksel olarak Draize testine ve klinik testlere dayanan kombine bir strateji kullanılmaktadır [81]. Akut deri iritasyonunun *in-vivo* değerlendirilmesinde kullanılan Draize testinin bir uyarlaması ise şu şekildedir: 0,5 mL (sıvılar için) veya 0,5 g (katılar için) seyreltilmemiş madde, üç albino tavşanın tıraş edilmiş derisine yama altında uygulanmaktadır. 4 saat maruz bırakıldıktan sonra yamanın çıkarılmasının ardından eritem ve ödem görsel olarak gözlemlenmekte ve puanlama gerçekleştirilmektedir [178-180].

Draize testi, Tablo 2.1'deki üzere sayısal puanlama sistemine dönüştürülen deri lezyonlarının (eritem ve ödem) günlük klinik gözlemlerini içermektedir [176]. Epidermis ve dermis boyunca gözle görülür haldeki nekroz benzeri reaksiyonlara hiçbir puan atfedilmemiş olup irritasyon ile ilgili deri lezyonlarının (örn. alopesi, hiperkeratoz, hiperplazi, pullanma) 14 güne kadar tersine çevrilebilirliği gözlemlenmiştir. Yöntem; her bir hayvan için maruziyet sonrası 1, 24, 48 ve 72 saat içerisinde eritem ve ödem için ortalama Draize puanlarının hesaplanmasına ve maddelerin irritasyona sebep olmayandan şiddetli irritasyona sebep olan derecesine kadar sınıflandırılmasına dayanmaktadır [176, 178, 179, 181].

**Tablo 2.1 :** Deri reaksiyonlarının derecelendirilmesi [176].

Eritem ve Yara Kabuğu Oluşumu	Puan	Ödem Oluşumu
Eritem mevcut değil.	0	Ödem mevcut değil.
Çok hafif eritem (belli belirsiz zor algılanır)	1	Çok hafif ödem (belli belirsiz zor algılanır)
İyi tanımlanmış eritem	2	Hafif ödem (belirli bir yükselme neticesinde alanın kenarları iyi belirlenmiş)
Orta ila şiddetli eritem	3	Orta derecede ödem (yaklaşık 1 mm yükselmiş)
Eritem derecelendirmesini engelleyen yara kabuğu oluşumuna kadar şiddetli eritem (sığır eti kızarıklığı)	4	Şiddetli ödem (1 mm'den fazla yükselmiş ve maruziyet alanının ötesine uzanan)

Protokollerin iyileştirilmesini, hayvan sayısının azaltılmasını ve *in-vivo* testlerin *in-vitro* test yöntemleri ile yer değiştirmesini amaçlayan modern yaklaşımlar ışığında Draize testi yeniden değerlendirilmiştir. Değerlendirme neticesinde, test maddesine maruziyet süresi 24 saatten 4 saate indirilerek hayvanlar için testin daha az stresli hale getirilmesi gibi birtakım iyileştirmeler yapılmıştır [77].

Draize testi; tekrarlanabilirliğinin düşük olması, yalnızca % 59 oranında doğruluk oranı sunması, yöntemin öznelliği, subjektif puanlama ve yorumlama, test hayvanlarında şiddetli ağrı ve strese neden olması sebebiyle eleştirilmektedir [63, 77, 182]. İlave olarak, insan sağlığı üzerindeki etkileri öngörme kapasitesinin

değerlendirilebilmesi adına karşılaştırmalı insan verilerinin bulunmaması ya da sınırlı olması nedeniyle hayvan testleri yetersiz kalmaktadır [175].

Bununla birlikte, gereksiz hayvan kullanımına ilişkin etik kaygılar ve verimli, düşük maliyetli klinik öncesi tarama testlerine duyulan ihtiyaç irritasyonun belirlenmesi üzere alternatif yöntemlerin geliştirilmesi hususunda itici güç olmuştur [81]. Tüm bu nedenler doğrultusunda deri irritasyonunun değerlendirilmesi için Draize testine alternatif olarak aşağıdaki yöntemlerden yararlanılmaktadır:

- Hücre sitotoksosite testleri

Nötral kırmızısı alımı testi (24 veya 48 saat maruziyet)

Nötral kırmızısı salım testi (5-30 dakika maruziyet)

Hücre protein testi

Plazminojen aktivatör testi

Tripan mavisi testi

MTT testi

Adenozin trifosfat (ATP) testi

Diğer sitotoksosite analizleri (Sitoplazmik enzimlerin salım ölçümleri, DNA sentezi ölçümleri, propidyum iyodür yöntemi)

- Hücre fonksiyonuna dayalı testler
- 3B kültür sistemleri ve doku modellerinin kullanımı [183, 184].

*İn-vitro* testler, *in-vivo* olarak insan derisinde meydana gelen olayları yeterince yansıtamamaktadır. Bu nedenle, irritasyonun belirlenebilmesini mümkün hale getirmek üzere çeşitli mekanizmalara dayanan tamamlayıcı yöntemlerin birarada kullanılması gerekli olabilmektedir [185]. Öte yandan ön inceleme yöntemi olarak kullanılan *in-vitro* testler, deneysel hayvan çalışmalarında veya klinik deneylerde şiddetli irritasyon reaksiyonlarının meydana gelme ihtimalini azaltmak adına da yararlı olacaktır [80].

İrritasyonun saptanmasına dair kullanılan alternatif yöntemlerden sıklıkla uygulananlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

### 2.10.1 Hücre sitotoksosite testleri

İnsan deri hücreleri üzerinde gerçekleştirilen hücre kültürü yöntemlerindeki son gelişmeler, hücre sitotoksosite testlerinin deri irritasyon testi için bir seçenek olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. Sitotoksosite testlerinin mevcut tavşan deri yama testlerinin yerini alabileceği ifade edilmiştir [77, 84]. Hücre sitotoksosite testleri, toksisite ve irritasyon etkilerinin tahmininde kullanılan yaygın test yöntemleri arasındadır [185]. *In-vitro* sistemlere kıyasla hücre kültürleri, insan derisinin verdiği yanıtları öngörme konusunda daha yüksek doğrulukta veriler sunma kabiliyetine sahiptir [186].

Anyonik yüzey aktif bir madde olan sodyum tetradecil sülfatın irritasyon etkisini değerlendirmek amacıyla insan keratinosit hücre hattında (HaCaT) sitotoksitesini çalışılmıştır. Hücrelerde ödemli şişme ve kütleşme, büyümenin inhibisyonu ve tutunma kaybı gibi doza bağlı morfolojik değişiklikler gözlenmiştir [187].

Yapılan bir çalışmada, kimyasalların insan epidermal keratinositleri ve keratinosit-dermal fibroblast ko-kültürlerindeki irritasyon etkileri değerlendirilmiştir. Test edilen yüzey aktif maddeler için doz-yanıt özellikleri ve *in-vitro* yanıtlar ile insan yama testi puanları (eritem ve ödem) arasında uyumluluk olduğu bulunmuştur. Sonuçlar, yama testi yanıtları ile her iki hücre kültüründeki hücre canlılığı ve enflamatuar sitokin salımı arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu da insan deri hücre kültürlerindeki hücre canlılığı, sitotoksosite ve enflamatuar sitokin salımı yanıtlarının irritasyonun değerlendirilmesi üzere kullanılabilirliğini göstermektedir [186].

Bileşiklerin deriye tatbik edilmesi ve stratum korneuma nüfuzlarının ardından temas ettikleri ilk canlı hücreler keratinositlerdir. Bu sebeple keratinositler, irritasyona neden olan maddeler için uygun bir hedef olarak görülmektedir. Buna karşın, tek katmanlı keratinosit kültür tekniği seçici geçirgen bariyer ve hücreler arası etkileşim gibi deri özelliklerinden yoksun olduğundan *in-vivo* yöntemlerin yerini tek başına tutamamaktadır [185, 187]. Bu bağlamda, irritasyon yanıtını olduğundan yüksek göstermesine karşın hızlı bir ön tarama aracı olarak keratinositlerden yararlanılabilmektedir [185]. Ancak elde edilen verilerin ihtiyatlı bir şekilde yorumlanması gerekmektedir.

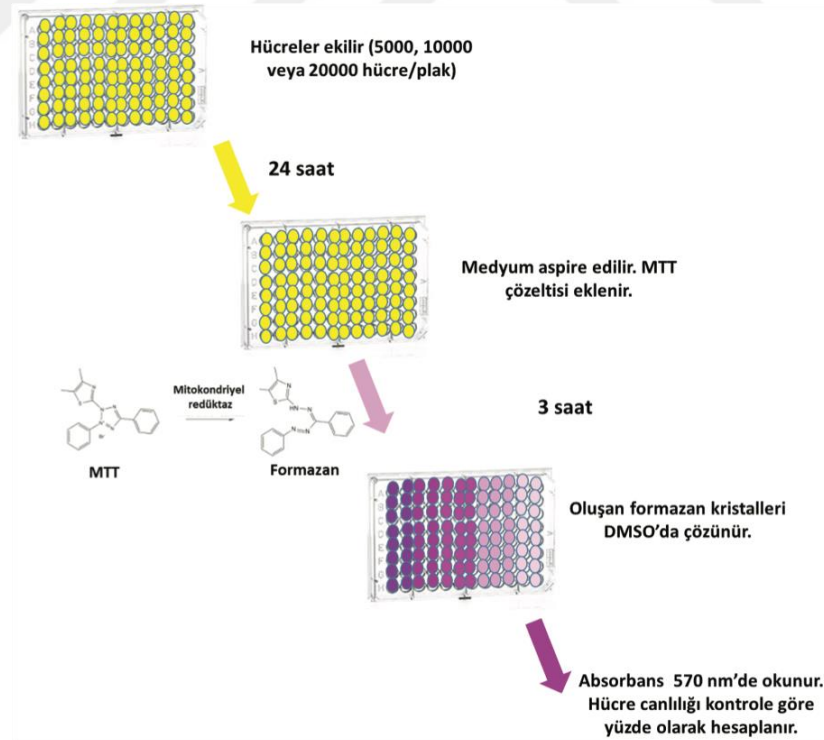
Keratinosit bazlı toksisite analizleri için 3B hücre kültürü sistemi geliştirmek üzere ölümsüzleştirilmiş HaCaT hücreleri kullanılmaktadır. 3B HaCaT hücre kültürü sistemi

deri ile ilgili genleri ve proteinleri ifade ederek test bileşiklerine karşı deri benzeri fenotip ve yanıt göstermiştir [188].

### 2.10.2 MTT testi

1983 yılında geliştirilen MTT yöntemi, hücre canlılığı testleri arasında “altın standart” olarak kabul edilmektedir. MTT; hücrelerin yanı sıra doku kültürlerinde de kullanılmakta olup deri irritasyonu, deri korozyonu ve göz irritasyonunun belirlenmesi üzere yapılan testlerde hücre canlılığının ölçümü için kullanılmaktadır [184]. MTT testi, farmasötik veya kozmetik ürün bileşimlerine dahil edilmek üzere tasarlanan kimyasalların deri irritasyon riskinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. [78].

Şekil 2.13'te aşamaları gösterilen MTT testinde, hücre canlılığının ve çoğalmasının kantitatif kolorimetrik tayini için tetrazolyum tuzu kullanılmaktadır. Tetrazolyum halkası aktif mitokondride parçalandığından reaksiyon sadece canlı hücrelerde gerçekleşmektedir. Dolayısıyla test ile ölü değil yaşayan hücreler tespit edilmekte ve sonuçlar yüksek hassasiyet ile spektrofotometrede (ELISA) okutularak sitotoksosite düzeylerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır [189].



Şekil 2.13 : MTT testinin aşamaları [184].

### 2.10.3 Üç boyutlu kültür sistemleri ve doku modelleri

3B kültür sistemleri ya da doku modellerinde, maruziyetin ve Draize testlerindeki gözlem süresine karşılık gelen inkübasyon süresinin sonunda MTT testi kullanılarak hücre canlılığı ölçülmekte ve canlılık verilerinden yola çıkılarak uygulanan bileşiğin irritasyon potansiyeli belirlenmektedir [182].

Espersen ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, doku modeli üzerinde yapılan histolojik incelemelerde uygulamadan sonraki 7. güne dek tutarlı bir hücresel değişiklik ve yanıt olmadığı görülmüştür. Bu netice, dokularda meydana gelen hücre canlılığı değişimlerinin saptanmasında MTT aktivitesi ölçümünün daha hassas bir yöntem olduğunu göstermektedir [182].

İzole edilmiş organ modelleri, hücre sitotoksosite testleri ve biyolojik olmayan sistemler gibi çok sayıda *in-vitro* model de hayvanlar üzerinde gerçekleştirilen irritasyon testlerine alternatif olarak önerilmiştir. Bariyer fonksiyonu ve enflamatuar sitokin salımı gibi derinin taşıdığı özellikleri kapsayan *in-vitro* insan derisi modellerinin kullanımının, epidermal enflamatuar yanıtın başlangıcının altında yatan mekanizmaların anlaşılmasına katkıda bulunacağı ve insanlarda risk değerlendirmesi amacıyla elde edilen verilerin eleştirel bir şekilde değerlendirilmesine olanak sağlayacağı düşünülmektedir [46].

Bu nedenle, biyomühendislik ürünü olan deri eşdeğer *in-vitro* modelleri, insanlar üzerindeki etkilerin ve toksisitenin hızlı, doğru ve spesifik şekilde değerlendirilmesini sağlayan hayvan deneylerine alternatif teşkil edebilmektedir [190].

Son yıllarda; bilimsel araştırmaların ilaç araştırmaları kısmını oluşturan klinik çalışmalara ve insan uygulamalarına yönelik geleneksel primer hücre kültürü çalışmalarının, sunduğu verilerin kısıtlı olduğu düşünülmektedir. Geleneksel olan iki boyutlu (2B) *in-vitro* hücre kültürleri; optik şeffaflık, substrat tutarlılığı, kolay kullanım, sağlamlık, tekrarlanabilirlik, nispeten düşük maliyet, elektrofizyoloji teknikleriyle uyumluluk ve yüksek verimli tarama gibi avantajlar sunmaktadır [191]. Kolay ve kullanışlı olmasına karşın 2B kültürler; hücrelerin karmaşık 3B bir çevre içinde büyüdüğü *in-vivo* durumun basit taklitlerini teşkil etmeleri ana sebep olmak üzere çok sayıda dezavantaj sergilemektedir [192]. Hücre çalışmalarından elde edilen doz ve terapötik etkinlik hakkındaki veriler bu bağlamda yol gösterici ilk çalışmalarlardır. Fakat hayvan deneyleri ve klinik çalışmalara geçildiğinde, organizmanın

gelişmişliğine ve kompleksliğine bağlı olarak bu verilerin yetersiz kaldığı hatta bazı durumlarda verilerin uyumsuzluk gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte 2B kültürler; dokular arasındaki arayüzün oluşturulması, *in-vivo* aktiviteleri, oksijen, karbondioksit, besin ve atıkların zamansal dağılımını düzenlediği bilinen diğer mikroçevresel faktörlerin özelleştirilmesi gibi zorlukları da içermektedir [193].

Etik kaygıların ötesinde hayvan modellerinin birçok hususta sınırlı kalması bir başka soru işaretini oluşturmaktadır. İnsan derisi ve hayvan modelleri arasındaki fizyolojik farklılıklar da araştırma sonuçlarının tutarsız olmasına yol açmaktadır [194]. Öte yandan *in-vivo* deneyler; *in-vitro* çalışmalara kıyasla daha zahmetli, pahalı ve zaman alıcıdır. Ayrıca, hayvan deneylerinin ardından klinik deneylere ulaşan ilaçların yaklaşık % 92'si için insanlar üzerinde güvenli ya da etkili olmadıkları için FDA onayı alamadıkları belirtilmiştir. FDA onayı alan ilaçların ise % 8'inin yarısı için hayvan testleri sırasında tespit edilemeyen yan etkiler dolayısıyla geri çekilmekte veya yeniden etiketlenmekte oldukları ifade edilmiştir [195].

Gerçekleştirilen birçok çalışma; hayvan modellerinin ve 2B doku modellerinin türler arası farklılık, gerçek zamanlı gözlem yetersizliği ve dinamik deneysel kontrol eksikliği gibi kritik sınırlamalar gösterdiğini ortaya koymuştur [196]. Mevcut eksiklikleri gidermek hedefiyle üzerinde çalışılmak istenen hücre hattını içeren 3B doku modelleri ve bu modelleri ihtiva eden test kitleri geliştirilmiştir.

Alternatif yöntemlerin oluşturulması esnasında, yöntemin validasyonu önemli bir sorun haline gelmektedir. Hatta çoğunlukla yeni geliştirilen alternatif yöntem sonuçlarının yayınlanmış verilerle karşılaştırılması ile validasyon elde edilmektedir. Özellikle deri irritasyon potansiyelinin değerlendirilmesi örneğinde karşılaştırma yapılan mevcut veriler çoğunlukla hayvan deneylerinden yani Draize tavşan testlerinden elde edilmektedir [197].

Dolayısıyla, geliştirilen bu modeller için otoritelerce validasyon yapılmış olup aralarında hayvan testlerine alternatif olarak kabul edilmiş test ve modeller bulunmaktadır. Dünya çapındaki biyoteknoloji şirketleri de geliştirdikleri ilaç ve biyoteknolojik ürünlerin testlerini gerçekleştirmek üzere doku mühendisleri tarafından geliştirilen 3B doku modellerini tercih etmektedir.

Örneğin, solunum sistemi hedefli bir biyoteknolojik ilaca dair gerçekleştirilecek ileri araştırmalar için primer insan alveolar epitel hücrelerinden oluşan 3B doku modeli

EpiAlveolar™’den yararlanılabilmektedir. Bir başka örnek olarak 3B *in-vitro* insan ince bağırsak doku modeli EpiIntestinal™ ile toksisite, metabolizma, ilaç emilimi çalışmaları yapılabilmektedir.

EpiOcular™ doku modelinin geliştirilmesini takiben model üzerinde çalışılarak hayvan testlerine alternatif olacak ve OECD test kılavuzlarınca (OECD TG 492) validasyonu yapılmış olan *in-vitro* EpiOcular Göz İritasyon Testi protokolü geliştirilmiştir. EpiOcular™ doku modeli hayvan testlerine alternatif bir *in-vitro* yöntem olarak göz ile temas eden materyallerin geliştirildiği çalışmalarda göz irritasyonu, kaşıntı ve yanma düzeylerinin değerlendirilmesinde endüstri tarafından uzun yıllardır aktif şekilde kullanılmaktadır.

Doku mühendisliği ile organ ve dokuların biyolojik açıdan benzerleri oluşturulabilmekte ve bu eşdeğer modeller ilaç, teşhis, araştırma çalışmalarında kullanılabilmektedir. Doku mühendisliği yöntemlerinin çoğunda canlı hücreler kullanılmaktadır. Bu hücrelerin fazla miktarda ve güvenilir bir şekilde tedarik edilmesi kritik önem taşımaktadır. Hücreler genellikle donör dokulardan veya kök hücrelerden elde edilmektedir [198].

Hücre kültürü sistemlerinin mühendisliğine yönelik ilk çabalar ile hücre şeklinin, konumunun, büyümesinin ve farklılaşmış dokulara özgü hücre işlevinin kontrolü için mikro-ortamlar sağlayan yapışkan alt tabakaların üretimine odaklanılmıştır. Farklılaşma, hücre ya da dokunun yapısal ve/veya işlevsel değişikliklere uğramasını ve *in-vivo* canlı dokulardaki benzer hücrelerin davranışlarına yakın özel davranışlar sergilemesini ifade etmektedir. Son on yıldaki gelişmeler, canlı doku ve organların 3B karmaşık mikroyapısını yeniden oluşturabilen gelişmiş hücre kültürü ortamlarının üretimini mümkün kılmıştır. Dokuları taklit edebilen mikro-ortamlar yeniden canlandırılmış ancak bu ortamların sadece hastalık mekanizmalarının kısmi evrelerini taklit edebildiği gözlemlenmiştir [199, 200].

Doku kültürleri, tek tip basit hücre tabakaları veya farklı hücre tiplerini ve bunlar arasındaki etkileşimleri içeren karmaşık 3B organotipik sistemler olarak üretilebilmektedir. Ayrıca bu sistemler, doku mühendisliği yoluyla hem yapısal hem de fizyolojik olarak doku ve organlara benzetmek amacıyla hücre dışı matriksten türetilen yapı iskeleleri üzerinde de yetiştirilebilmektedir [201]. Şekil 2.14’te

aşamaları şematize edilen 3B biyobaskı teknolojisi de ilaç test platformları ve modeller oluşturmak üzere katkılar sağlamaktadır [202].



**Şekil 2.14 :** Biyobaskı sürecinin aşamaları [202].

Tasarlanan 3B doku modelleri; toksisite testlerinin, hastalık mekanizmalarının, ilaç testlerinin, terapötik etkilerin ve ilaç etkinliğinin, sağlıklı ve patolojik dokulardaki temel hücre biyolojisinin daha iyi anlaşılması üzere hayvan modellerine ve geleneksel 2B kültür modellerine alternatif olarak geliştirilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır [196, 200].

Madi ve diğerleri tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; insan derisinden primer insan dermal fibroblastları izole edilmiştir. İnsan dermal dokusunu oluşturmak hedefiyle geliştirilen 3B doku üzerinde DNA elektrotransferinde hücre dışı matriksin rolü araştırılmıştır [203].

Choe ve ark. fizyoloji ve patofizyoloji çalışmalarında kullanmak üzere insan bronşiyal mukozası için bir doku modeli geliştirmiştir. Geliştirilen modelin; fizyolojik olarak hücre dışı matriks, fonksiyonel silialar, silli hücreler, mukus salgılayan hücreler, bazal hücrelere dönüşen epitel farklılaşma, mukus salgısı, tip I kolajen içinde fibroblast içeren farklılaşmış bir epitel sunarak insan solunum yolunun karakteristik özelliklerini ve işlevlerini sağladığı belirtilmiştir [204].

### **2.10.3.1 İnsan derisi doku modelleri**

Son on yılda, insan derisi eşdeğerleri veya organotipik kültürler olarak bilinen insan derisini taklit eden 3B *in-vitro* doku modellerinin geliştirilmesi ile epidermal hücre biyolojisinin anlaşılabilirliği ileri seviyeye taşınmış ve bu bağlamda yeni deneysel sistemler kazandırılmıştır [205].

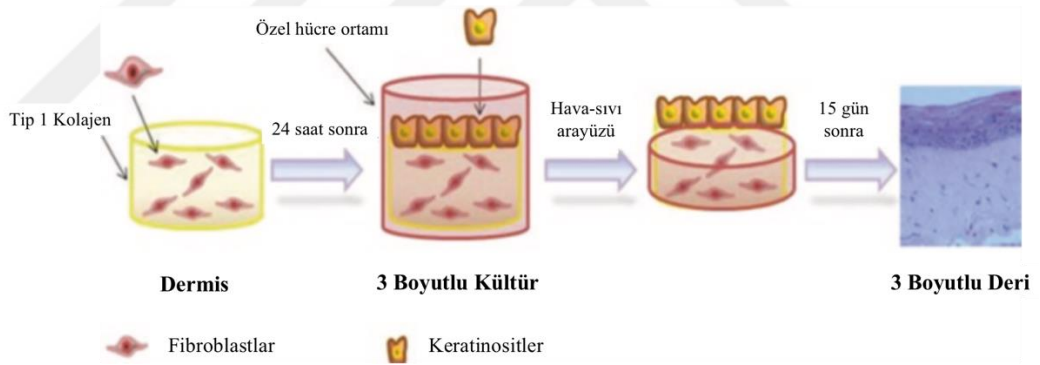
*In-vitro* deri kültürü sistemlerinin değerlendirilmesinde en önemli kriterlerden biri etkin bir seçici geçirgen bariyerin mevcudiyetidir [206]. RhE'ler; stratum korneumun

lipit yapısı, sıkı bağlantı bariyerleri ve deri yüzeyinin pH değeri olmak üzere insan derisi ile benzer özellikler taşımaktadır. RhE, keratinosit ve fibroblast hücreleri başta olmak üzere öncesinde 2B kültürde çoğaltılan ardından canlı ve etkileşimli bir yapı oluşturmak üzere kademeli olarak birleştirilen hücresel bileşenlerden oluşmaktadır [207].

3B deri modeli teknolojisi, çok hücreli karmaşık deri fizyolojisini daha verimli temsil edecek şekilde matriks üzerine yerleştirilmiş basit keratinositlerden (RhE) ve üstüne keratinosit yerleştirilmiş dermal-kolajen matriksinden (tam kalınlıkta RhE) geliştirilmektedir [63].

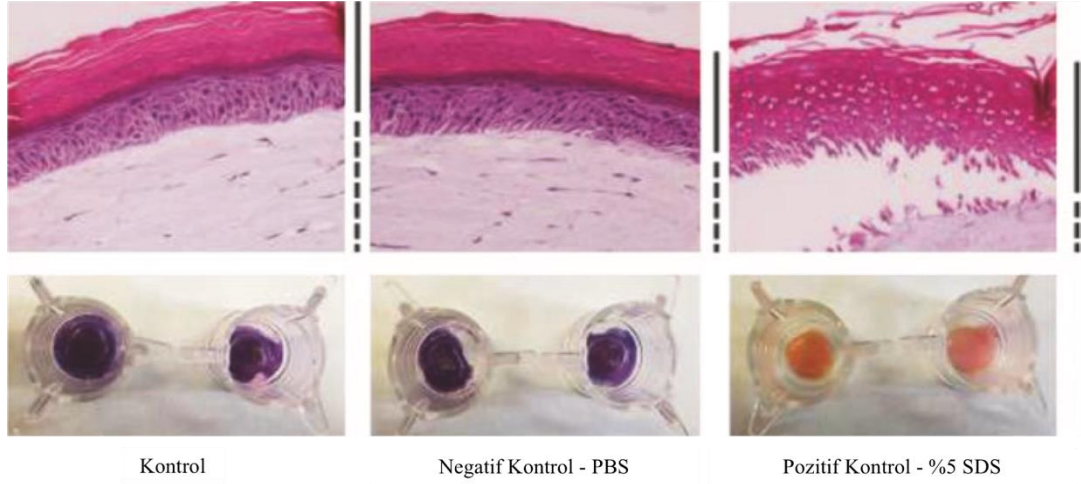
Doku mühendisliği, hücre dışı doğal matriks açısından zengin bir RhE dokusunun üretilmesine olanak tanımaktadır. Primer insan dermal fibroblastları, kolajence zengin bir 3B hücre dışı matriks salgılayarak ve bu matriksi düzenleyerek doğal çevreyi yani matriksi yeniden üretebilmektedir [208].

Şekil 2.15'te 3B RhE modelinin yapım aşamaları gösterilmektedir.



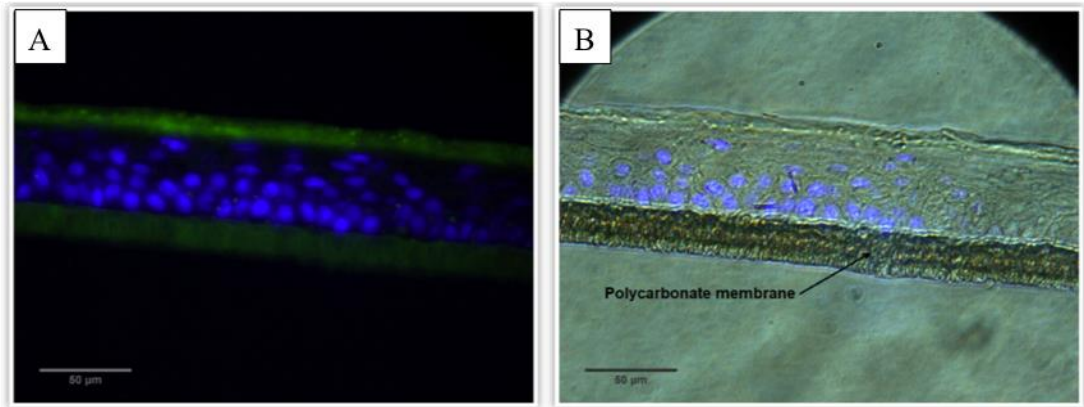
**Şekil 2.15 :** Üç boyutlu yeniden yapılandırılmış epidermal modelin oluşturulma basamakları [209].

Bir çalışmada; epidermal modele yapılan uygulamadan sonra doku insertlerindeki farklılaşma ve deri kalitesini incelemek amacıyla histolojik değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Eşdeğer modelde epiderminin varlığı doğrulanmış ve uygulamaların eşdeğer deri modeli üzerine etkileri incelenmiştir. Şekil 2.16'da görüldüğü üzere, pozitif kontrolde dermis ve epiderminin ayrılmasıyla birlikte epidermiste bozulma ve epidermal hücrelerde hücresel yapı hasarına işaret eden hücre boşlukları görülmüştür. Fosfat tamponu çözeltisi (PBS) uygulanan negatif kontrol gruplarının ise sağlıklı, hücrelerin histolojik ve hücresel yapılarının korunmuş ve MTT'de hücre canlılığını gösteren morumsu renk olduğu tespit edilmiştir [210].



**Şekil 2.16 :** Deri irritasyon modelindeki kontrollerin histolojik kesitleri (Kesikli çizgi; dermis, düz çizgi; epidermis, mor doku; canlı doku, beyaz doku; hücre ölümü) [210].

Pinto ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, geliştirdikleri *in-vitro* RhE modeline uygulanan nanopartikül formülasyonunun stratum korneumda hücreler arasındaki lipit arayüzünde biriktiği ve daha sonra bu partiküllerin hücreler arası geçiş yolunu takip ettiği ifade edilmiştir. Şekil 2.17’de  $\alpha$ -Tokoferol yüklü ve floresan işaretli NLTlerin (TOC-DiONLT) yeşil rengin yoğun olduğu stratum korneumun üst katmanında konumlandığı ve ardından floresan işaretli  $\alpha$ -Tokoferol’ün nanopartiküllerden salındıktan sonra membrandan geçtiği gözlenmiştir. [50].



**Şekil 2.17 :** TOC-DiONLT'lerin *in-vitro* deri emilimine ait görüntüler. (A) İnsan epidermis modeli kesiti. (Mavi; hücre çekirdekleri, yeşil; TOC-DiONLT) (B) Hücre etrafındaki yapıyı gösteren (A) modele ait kesit [50].

### 2.10.3.2 İrritasyonun Saptanmasına Yönelik Doku Modelleri

Yakın gelecekte, hayvan deneylerinin yasaklanabilme ihtimali ve insanların doğrudan ilk denek olamayacağı göz önünde bulundurularak deri irritasyonunun

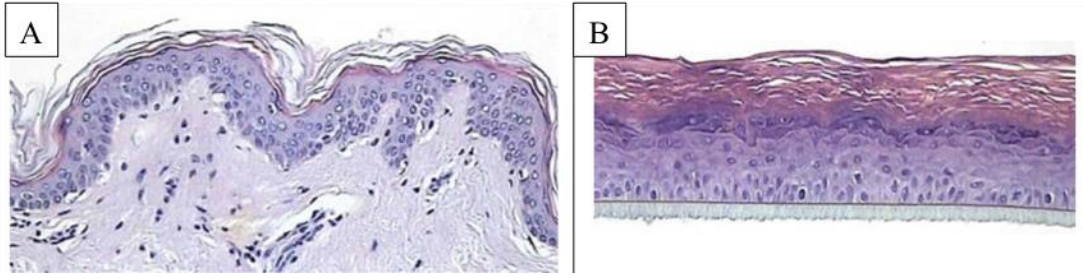
değerlendirilmesi üzere alternatif *in-vitro* yöntemler geliştirilmiştir. Deri irritasyonunun saptanması üzere birçok hücresel fonksiyona dayalı test ve hücre sitotoksikite testleri denenmiştir. Gerçek *in-vivo* deriyi taklit etme hususunda daha başarılı olduğundan 3B kültür sistemleri umut verici olarak görülmüş ve bazıları ticarileştirilmiştir. Birçok deneysel ortamda, *in-vitro* deri irritasyon testlerinin nihai hedef olan insan *in-vivo* test sonuçları ile yüksek derecede uyumluluk gösterdiği ifade edilmiştir [183].

Deri irritasyonu üzerine laboratuvar hayvanlarında yapılan testler hayvanlarda ciddi boyutlarda rahatsızlık ve ağrıya neden olabilmektedir. Bu kapsamda, örneğin dermal korozyonun (CORROSITEX™, EPISKIN™, EpiDerm™ gibi insan derisi modellerinin kullanıldığı testler) ve irritasyonun (örneğin hücre hatları, birincil tek katmanlı kültürler, deri dilimleri, organ kültürleri ve RhE eşdeğerlerine dayanan *in-vitro* hücre ve doku kültürü modelleri, model içeren farklı ticari kitler) değerlendirilmesi için çeşitli alternatif yöntemler geliştirilmiştir [77, 211].

Deri irritasyonunun saptanmasına yönelik geliştirilen insan deri eşdeğer modelleri, insan keratinositlerinin veya fibroblastlarının tek katmanlı hücre kültürlerinden epidermisin 3B modellerine kadar uzanan bir çeşitlilik göstermektedir. Genel itibariyle hücre kültürleri, tekli bileşenlerin deri hücreleri üzerindeki etkilerini (proliferasyon kapasitesi, farklılaşma, kolajen sentezi ve sitokin ifadesindeki değişiklikler vb.) test etmek üzere kullanılmaktadır. Yapay insan dokuları ise karışımları ve nihai formülasyonları test etmek üzere kullanılmakta olup bu modellerde dokuların daha çok farklılaşmasına izin verilerek insanlarda irritasyon potansiyelinin belirlenmesinde önemli bir bariyer işlevi gören stratum korneumun oluşumu mümkün kılınmaktadır [212].

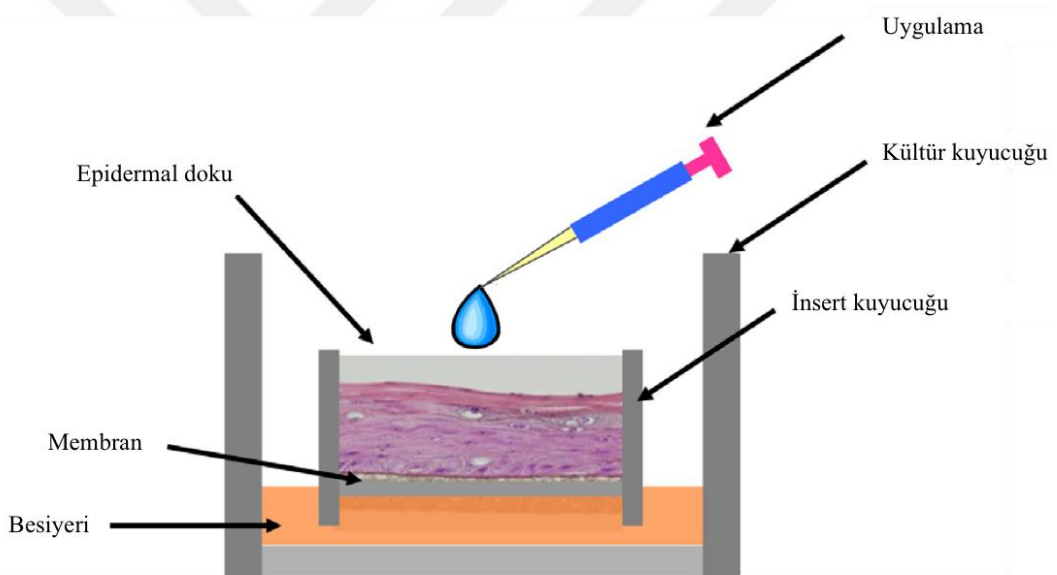
Dermal eşdeğer model üzerinde yetiştirilen keratinositlerin hava-sıvı arayüzünde yetiştirildiklerinde tabakalaştığı ve farklılaştığı, kültür ortamına daldırılmış halde yetiştirildiklerinde ise farklılaşmamış tek tabaka olarak kaldıkları tespit edilmiştir [213]. Şekil 2.18'de görüldüğü üzere RhE modelleri, klasik tek katmanlı hücrelerin aksine insan derisini taklit edebilmektedir. Bu 3B modeller, keratinosit kültürlerinin çeşitli substratlar üzerinde hava-sıvı arayüzünde büyüme kabiliyetine dayanarak saf veya seyreltilmiş test malzemelerinin topikal olarak model üzerine uygulanmasını mümkün hale getirmektedir. Modellerin yüzeyi havaya maruz kalabilmektedir. Bu durum, kimyasal bileşiklerin irritasyon potansiyelinin tek katmanlı hücre kültürlerine

kıyasla *in-vivo* özelliklere daha benzer koşullar altında değerlendirilebilmesine olanak tanımaktadır [214].



**Şekil 2.18 :** (A) *İn-vivo* insan epidermisi ve (B) 3B insan epidermis modeli (SkinEthic Laboratories) için histolojik kesit karşılaştırması [174].

Şekil 2.19’da ise EpiDerm™ modeli üzerinde yapılan topikal bir uygulama şematik olarak gösterilmiştir.



**Şekil 2.19 :** EpiDerm™ uygulamasına dair şematik gösterim [215].

ECVAM (Avrupa Birliği Alternatif Metotlar Validasyon Merkezi), deri iritasyon modellerinin validasyonu için 2003 yılında analizlere başlamıştır. Takip eden yıllarda EpiSkin™, EpiDerm™ ve SkinEthic™ gibi çok sayıda *in-vitro* deri iritasyon testini kapsayan model ECVAM tarafından OECD kılavuzlarınca (OECD 439) *in-vivo* tavşan deri iritasyon testinin yerini almak üzere onaylanmıştır [216].

Validasyon çalışmalarının tamamlanmasıyla, insan deri eşdeğer modellerinin *in-vitro* deri iritasyon testlerinde kullanımına yönelik performans standartları tanımlanmıştır. Bu standartlar, ilerleyen yıllarda benzer bilimsel esaslara dayanan ve aynı biyolojik

veya toksik etkiyi ölçen ya da tahmin eden diğer benzer test yöntemlerinin ("me-too" testleri) de doğruluğunu ve güvenilirliğini değerlendirmek üzere kullanılmıştır [174].

Güncel çalışmalar incelendiğinde, RhE modellerinin kimyasalların sebebiyet verebileceği deri hassasiyetini *in-vitro* yöntemlerle belirlemek üzere doğrulanmış olduğu görülmektedir. İlave olarak bu modeller; kozmetik, ilaç ve tıbbi cihazlar için gerçekleştirilen ve yasal otoritelerce talep edilen güvenlik testlerinde de kullanılabilir [88]. İnsan deri *in-vitro* modelleri, enflamatuar yanıtta görevli olan dolaşım ile bağlantılı damarsal unsurları içermemesine karşın deride enflamatuar yanıtın başlatılmasında önemli rolü olan hücre tipini (epidermal keratinosit) içermektedir [80]. Modellerden elde edilen *in-vitro* sonuçlar ve insanlardaki klinik yanıtlar karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda, irritasyona neden olan bir maddeye yanıt olarak deri eşdeğer modellerinden salınan proenflamatuar mediatörlerin o maddenin insan derisindeki irritasyon potansiyeline dair fikir edinmek üzere yararlı olduğu gösterilmiştir [81].

RhE test sistemi, farmasötik ürünlerin deri irritasyon potansiyelinin öngörülmesine yönelik toksisite analizlerinde kullanılmış ve bitmiş ürünlerin test edilmesi üzere özel bir protokol geliştirilmiştir. Test maddelerini, irritasyona neden olan (I) ve irritasyona neden olmayan (NI) şeklinde sınıflandırmak üzere eşik değeri % 50 canlılık olarak belirlenmiştir. Bu eşik değerinin altındaki canlılık oranı ise irritasyona neden olan (I) olarak kabul edilen bir öngörü modeli tanımlanmıştır [174].

Nagasawa ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, povidon-iyot dahil olmak üzere klinik kullanımlarına yönelik çeşitli antiseptiklerin deri irritasyon potansiyelleri ticari olarak temin edilen 3B deri modelleri üzerinde değerlendirilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, 3B deri modeli ile gerçekleştirilen deri irritasyon çalışması verilerinin *in-vivo* çalışma sonuçlarıyla uyumluluk gösterdiği ve bu uyumun 3 dakikalık ve 10 dakikalık uygulama gruplarında 30 dakikalık gruba göre daha yüksek olduğu görülmüştür [214].

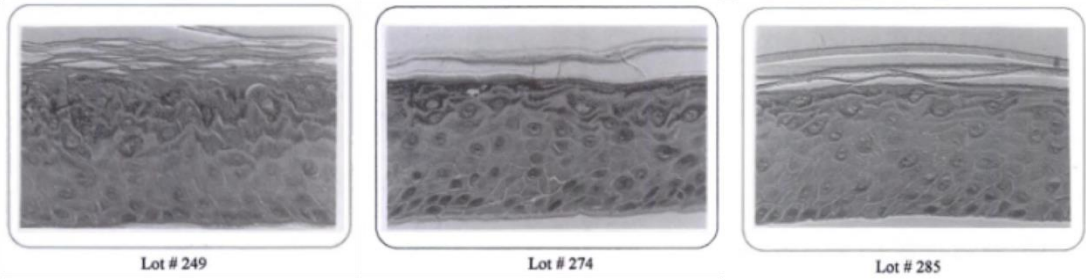
### **2.10.3.3 Üç boyutlu yeniden yapılandırılmış insan epidermal (RhE) modeli**

#### **EpiDerm™**

EpiDerm™, insan kaynaklı keratinositlerden oluşan bir RhE modelidir. Modelin üretimi aşamasında keratinositler, özel olarak hazırlanmış geçirgen hücre kültürü insertleri üzerinde kültürlenerek olgun epidermin karakteristik ve gelişmiş

farklılaşma seviyelerine ulaşılabilir [217]. Model; insan epidermisinin tabakalı, oldukça farklılaşmış, organotipik benzeri bir doku modelini üretmek üzere kimyasal ortamda yetiştirilen sağlıklı insan epidermal keratinositlerinden oluşmaktadır [73]. Modelde, düzenli tabakalardan ve *in-vivo*ya benzer şekilde dizili hücreler arası lipid tabakaları içeren çok katmanlı bir stratum korneum mevcuttur [218]. Stratum bazale, stratum spinosum, stratum granulosum ve çekirdeksiz stratum korneum dahil olmak üzere tüm hücre katmanları bulunmaktadır [219].

Ayrıntılı şekilde incelendiğinde; Şekil 2.20’de yer alan histoloji mikrograflarında büyük çekirdekli bir bazal tabaka, bir miktar yassılaştırmış hücreler ve daha az (daha küçük) çekirdekli bir spinöz tabaka, keratohyalin granülleri ile doldurulmuş granül tabakası ve oldukça yassılaştırmış, çekirdeksiz hücrelerden oluşan bir stratum korneum tabakası görülmektedir [220].



**Şekil 2.20 :** Rastgele seçilmiş EpiDerm™ numunelerinin histolojik kesitleri [220].

EpiDerm™ modelinin lipid profili; sağlıklı insan derisinin epidermisine benzer miktarda tüm lipid sınıflarını (fosfolipitler, sfingomiyelin, fosfatidilkolin, fosfatidilserin, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamin, kolesterolsülfat, glukosfingolipitler, seramidler, serbest yağ asitleri, kolesterol, lanosterol, digliseritler, trigliseritler ve kolesterol) içermektedir [221]. İnsan deri dokusunda bulunan farklılaşmaya özgü bir dizi protein ifadesinin değerlendirilmesi sonucunda keratin 6, deri kaynaklı antilökoproteinaz, prolince zengin proteinler, involukrin ve transglutaminazın EpiDerm™ modelinde de ifade edildiği saptanmıştır [222].

*In-vitro* deri modelleri, deri kaynaklı mediatörlerin enflamatuvar yanıtlardaki görevini aydınlatmak üzere tasarlanan araştırmalarda yararlı olmaktadır [223]. EpiDerm™ modelinin; IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-15, Prostaglandin E, Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (GM-CSF) ve TNF- $\alpha$  gibi enflamatuvar ve immünomodülatör sitokinleri ifade ettiği tespit edilmiştir. IL-10 ve IL-8 için en yüksek ifade seviyeleri

görülürken IL-6, IL-15 ve GM-CSF en düşük ifade seviyelerini göstermiştir. IL-10 için ise gen ifadesi tespit edilememiştir [223, 224].

İnsan epidermisini çok yakından taklit etmesi nedeniyle dermal maruziyetin ve toksisitenin öngörüldüğü çalışmalarda; örneğin kimyasalların deri aşındırma testlerinde, kozmetik ürün ve hammaddelerin deri irritasyon çalışmalarında, fototoksosite ve deri penetrasyon çalışmalarında kullanılmak üzere EpiDerm™ modelinin bilimsel geçerliliği doğrulanmıştır [225].

Model kapsamında irritasyon testi, EpiDerm™ modelinin topikal olarak test maddesine maruziyetinin ardından MTT uygulamasıyla oluşan mavi formazan tuzunun dokulardan ekstraksiyonu ve hücre canlılığının kantitatif olarak ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir. Negatif kontrollere kıyasla test maddelerine maruz kalan dokularda görülen hücre canlılığındaki azalma, test maddelerinin deri irritasyon potansiyelini öngörmek üzere kullanılmaktadır [226].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Maddeler ve Cihazlar

Tez çalışması süresince kullanılan maddeler, yararlanılan cihazlar ve araç gereçler aşağıdaki başlıklarda ifade edilmiştir.

##### 3.1.1 Kullanılan Maddeler

Çalışma süresince kullanılan maddeler Tablo 3.1’de detaylıca belirtilmiştir.

**Tablo 3.1** : Kullanılan maddeler.

Adı	Marka
Aromatik Turmeron	Cayman Chemical-Amerika
Asetik Asit	Merck-Almanya
Asetonitril	İsolab-Almanya
Compritol® 888 ATO (Gliseril behenat)	Gattefossé-Fransa
DMSO	İsolab-Almanya
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	MatTek-Amerika
Etanol	Merck-Almanya
EPI-100-NMM Besiyeri	MatTek-Amerika
FBS	Thermo Fisher Scientific
Fosforik asit	Merck-Almanya
İzopropanol	İsolab-Almanya
Kurkumin	Sigma Aldrich
MTT	Sigma Aldrich
Plantacare® 810 (Kapril glukozit)	BASF-Türkiye
Potasyum dihidrojenfosfat	Merck-Almanya
Sodyum dodesil sülfat	MatTek-Amerika
Tween 80	Sigma Aldrich

### 3.1.2 Kullanılan Cihazlar ve Araç Gereçler

Çalışma süresince yararlanılan cihazlar ve araç gereçler Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

**Tablo 3.2 : Yararlanılan cihazlar ve araç gereçler.**

<b>Adı</b>	<b>Marka</b>
Altı kuyucuklu plaka	Nest
Amber renkli cam vial	İsolab
Biyogüvenlik kabini	Faster SafeFAST
Buzdolabı	Beko
C18 kolon	Inertsil 5µm, 250x4.6mm
Distile su cihazı	Human Power I
Diyaliz membrane	Spectra/Por
EpiDerm™ kiti	MatTek
Etüv	Memmert
Floresan mikroskobu	Zeiss Axio Observer Z1
Hassas Terazı	Ohaus
Manyetik ısıtıcı karıştırıcı	Heidolph
Partikül boyutu ve Zeta ölçüm cihazı	Malvern, Nano ZSP
Pastör pipeti	İsolab
Penset	Rodus
pH-metre	Mettler Toledo
Prob uç	Bandelin MS 73
Santrifüj	Hermle Z 326 K
Spektrofotometre	BioTek Powerwave XS
Steril eküvyon çubuğu	True Line
Steril enjektör	Genject
Steril gazlı bez	DS Sağlık
Taramalı Elektron Mikroskobu	Thermo Scientific, Quattro ESEM
Homojenizatör	IKA, Ultra-Turrax T25
Ultrasonik banyo	Elma 660/H
Ultrasonik Homojenizatör	Bandelin Sonopuls
Yatay çalkalayıcı	Stuart
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Shimadzu LC20-AT

## 3.2 Yöntem

### 3.2.1 Aktif bileşenlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile standart doğrularının çizilmesi

Kurkumin’in ve Turmeron'un miktarını belirlemek üzere yapılan analizlerde, Şekil 3.1’de görülen Shimadzu LC20-AT yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (YBSK)

sisteminden (Shimadzu, Kyoto, Japonya) ve Shimadzu SPD-20A UV-Vis dedektöründen yararlanılmıştır.

Kurkumin için asetonitril (ACN) : fosfat tamponu (fosforik asit kullanılarak pH 3'e ayarlanmıştır) (80:20, h/h), Turmeron için ise ACN : % 0,4 (h/h) asetik asit içeren ultra saf su (45:55, h/h) mobil faz olarak kullanılmıştır. Kurkumin için 35 °C fırın sıcaklığı sağlanmıştır. C18 kolon (250x4,6 mm; 5 µm-GL Sciences Inert Sustain) aracılığıyla ayırma, mobil faz akış hızı 1,0 mL/dakikalık düşük basınç gradyanı koşullarında gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 µL olmak üzere Kurkumin için 420 nm'de, Turmeron tespiti için 240 nm'de UV dedektörü uygulanmıştır.



**Şekil 3.1** : Kullanılan YBSK cihazı.

Miktar tayini çalışmalarında kullanılmak üzere Kurkumin ve Turmeron için standart doğruları oluşturulmuştur. 10 mg Kurkumin ve 10 mg Turmeron iki farklı balon jöjeye eklenerek ACN içerisinde çözündürülmüş ve hacimce 100 mL'ye tamamlanmıştır. Böylelikle 0,1 mg/ml konsantrasyona sahip stok çözeltiler hazırlanmıştır. Standart doğrularının çizilmesi için kılavuzlarda belirtildiği üzere en az 5 farklı konsantrasyon değeri önerilmektedir.

Buradan hareketle stok çözeltilerden seyreltmeler gerçekleştirilerek sırasıyla 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml ve 0,05 µg/ml olmak üzere 7 farklı konsantrasyonda olmak üzere örnekler hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için üç paralel örnek ile çalışılmıştır. Örneklerin YBSK sisteminde oluşturdukları eğri altı

alanları ile konsantrasyonlara karşı grafikler oluşturulmuştur. Elde edilen doğruların denklemleri ve determinasyon katsayıları hesaplanmıştır.

### **3.2.1 Analitik yöntem validasyonu**

Analitik bir yöntemin kabul edilebilir olmasını sağlayan validasyona dair parametreler aşağıda belirtilmiştir:

- Doğrusallık (Linearity)
- Doğruluk ve Geri Elde Edilebilirlik (Accuracy and Recovery)
- Kesinlik (Precision)
  - Tekrar edilebilirlik (repeatability)
  - Tekrar elde edilebilirlik (reproducibility)
- Özgünlük, Seçicilik (Specificity)
- Teşhis ve Tayin Sınırları (LOD ve LOQ)
- Dayanıklılık, stabilite (Stability)

#### **3.2.1.1 Doğrusallık**

Doğrusallık; örnekte bulunan etken maddenin belirli sınırlar içerisindeki konsantrasyonu ile elde edilen absorbans değerinin orantılı olduğuna dair bir göstergedir. Bu amaçla, konsantrasyona karşılık gelen eğri altındaki alan değerlerinin doğrusal regresyon yöntemi ile regresyon doğrusu hazırlanmaktadır. Yöntem 3.2.1’de detaylıca bahsedilen standart eğrisinin çizimine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Determinasyon katsayısı ile doğrusallık değerinin tayini yapılmıştır.

#### **3.2.1.2 Doğruluk ve geri elde edilebilirlik**

Doğruluk ve geri elde edilebilirlik, tespit edilen deneysel değerlerin gerçek absorbans değerine yakınlığını ölçmek üzere yapılan çalışmalardır. Miktar tayini yönteminin doğruluğu, geri alma yüzdesine bağlıdır.

Kurkumin ve Turmeron için 20, 10 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarında 3 farklı örnek hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler Kurkumin için 420 nm, Turmeron için ise 240 nm dalga boyunda arka arkaya 6 kez YBSK ile okutulmuştur. Bu alan değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri standart doğrular yardımıyla hesaplanmıştır.

Hesaplanan konsantrasyon değerlerinden % geri elde değerleri denklem 3.1’de belirtildiği gibi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Geri Elde} = \frac{C_{Pratik}}{C_{Teorik}} * 100 \quad (3.1)$$

C Pratik: Etken maddelerin kalibrasyon denkleminde elde edilen konsantrasyon değerleri

C Teorik: 20, 10 ve 5 µg/ml

### 3.2.1.3 Kesinlik

Kesinlik, miktar tayini yöntemi için gerçekleştirilen birbirini takip eden ölçümler arasındaki yakınlık derecesidir. Tekrar edilebilirlik ve tekrar elde edilebilirlik derecelerinin de bir ölçüsüdür. Standart sapma (SS) ve varyasyon katsayısı ile ifade edilmektedir. Analitik yöntemin kesinliği için aynı konsantrasyondaki örnek istatistiksel olarak yeterli değerlendirilmenin yapılabileceği sayıda art arda ölçülerek aritmetik ortalama, SS ve bağıl standart sapma (% BSS) değerleri hesaplanmış ardından değerlendirilmiştir.

#### 3.2.1.3.1 Tekrar edilebilirlik

Tekrar edilebilirliğin belirlenmesi için standart doğru denklemi oluşturmak üzere hazırlanan stok çözeltilerden bir konsantrasyon (5 µg/mL) seçilmiştir. Ardından bu konsantrasyondaki çözeltinin eğri altı değeri YBSK sistemi ile arka arkaya 6 kez ölçülmüştür. Bu ölçümlerde okunan eğri altı alanı için ortalama (ORT) ve SS değerleri ile % BSS hesaplanmıştır.

BSS’nin % 2’den az olması yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

#### 3.2.1.3.2 Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için aynı stoktan hareket edilerek seyreltme ile hazırlanan 6 adet aynı konsantrasyondaki (5 µg/ml) çözeltinin eğri altı alan değerleri ölçülmüştür. Bu alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerinin ORT, SS, BSS değerleri hesaplanmıştır.

Bulunan varyasyon katsayısının % 2’den küçük olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

#### **3.2.1.4 Özgünlük, seçicilik**

YBSK yönteminin, analiz edilmek istenen maddeyi formülasyondaki veya ortamdaki diğer maddelerden ayırabilme kabiliyetinin olması gerekmektedir. Kurkumin ve Turmeron piklerinin diğer maddelerin pikleri ile çakışıp çakışmadığı gösterilmiştir. Bu amaçla, ACN ve *in-vitro* salım çalışmalarında reseptör faz olarak kullanılan fosfat tamponu: Tween 80 (19:1) çözücülerinin ve etken madde çözeltilerinin YBSK sistemine enjeksiyonları yapılarak etken maddelerin alıkonma zamanlarında herhangi bir pik olup olmadığı incelenmiştir.

#### **3.2.1.5 Teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ)**

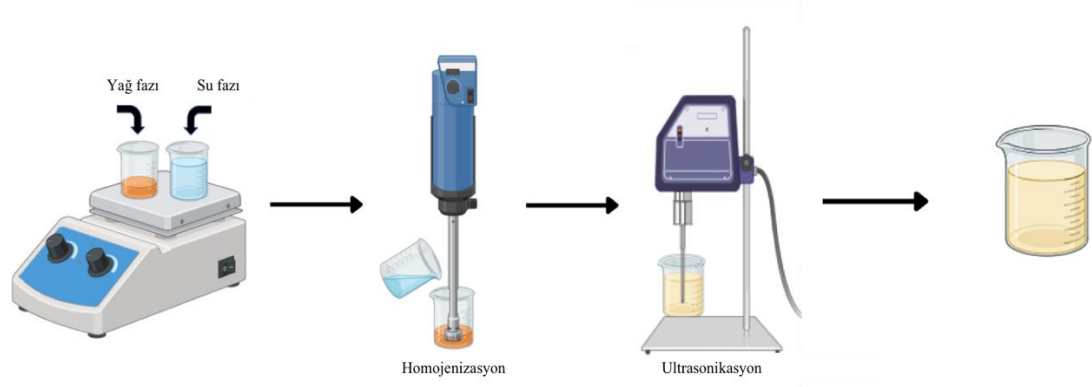
Teşhis sınırı (limit of detection: LOD), analizi gerçekleştirilen maddenin kabul edilebilir düzeyde doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile tespit edilebileceği en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir. Sinyal/gürültü oranının 3,3 katı olarak kabul edilmektedir.

Tayin sınırı (limit of quantitation: LOQ) ise analizi gerçekleştirilen maddenin tayin edilebileceği en düşük konsantrasyonu ifade etmektedir. Sinyal/gürültü oranı 10 ile çarpılarak tayin sınırı belirlenmiştir.

Bu sınırlar, düşük konsantrasyondaki bir seri örneğin analiz edilmesi ile belirlenmiştir. Kalibrasyon eşitliğinde en düşük değere karşılık gelen alanların SS değerleri hesaplanmıştır. Ardından bu değerlerin ortalaması, seçilen kalibrasyon eğrisinin eğimine bölünmüştür. Bu değer 3,3 ile çarpılarak teşhis sınırı, 10 ile çarpılarak ise tayin sınırı belirlenmiştir. Saptama sınırı ve tayin sınırı çalışmalarında 10'ar örnekle çalışılmıştır.

#### **3.2.2 Katı lipit nanopartikül formülasyonunun geliştirilmesi**

KLN formülasyonları, Şekil 3.2'de basamakları gösterildiği üzere yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır [135, 227-229]. Katı lipit olarak mono, di ve trigliseritlerin bir karışımı olan Compritol® 888 ATO (C888) seçilmiştir. Yüzey etken madde olarak ise iyonik-olmayan Plantacare® 810 (P810) seçilmiştir.



**Şekil 3.2 :** KLN'lerin hazırlanmasını kapsayan basamaklar (Biorender ile oluşturulmuştur.).

Kurkumin ve Turmeron tartılarak katı lipid C888 ile karıştırılmıştır. Ardından 85°C'de karışım eritilmiştir. Eriyen lipid içerisinde Kurkumin ve Turmeron homojen halde çözünene kadar 300 rpm'de manyetik karıştırıcı üzerinde sabit sıcaklıkta bekletilmiştir. Aynı zaman diliminde P810 bidistile suya eklenmiş ve elde edilen su fazının sıcaklığı da 85 °C'ye getirilmiştir.

Erimiş haldeki lipitin sıcaklığının düşerek yeniden katılaşmasını önlemek amacıyla sıcak su banyosunda tutulan lipid fazına homojenizatör (Ultra-Turrax T25) uygulanırken aynı sıcaklıktaki su fazı yavaşça eklenmiştir. 20.000 rpm'de beş dakika boyunca homojenize edilmiştir. Ardından 10 dakika, 10 devirde (9 s “on”, 1 s “off”) ve % 40 enerji uygulaması ile ultrasonikasyon uygulanmıştır. (prob; MS 73, Bandelin Sonopuls UW 2070, Berlin, Almanya). Daha sonra, formülasyonlar oda sıcaklığına getirilmiştir. Oda sıcaklığına ulaştıktan sonra beherlerin ağzı parafilm ile kapatılarak formülasyonlar buzdolabında + 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Yapılan her denemenin ardından KLN'lerin enkapsülasyon etkinliği hesaplanmış ve partikül boyutu ölçülmüştür. Bu verilerden yola çıkılarak optimum formülasyon seçilmiştir. Ardından üç paralel örnek olarak hazırlanan optimum formülasyonun karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3.1 Deneysel tasarım

KLN formülasyonlarının optimizasyonlarını gerçekleştirmek üzere YYM'den yararlanılmıştır. Önformülasyon ve deneme çalışmalarının neticelerinden yola çıkılarak C888 ve P810 miktarları, KLN özelliklerini etkileyen iki temel değişken olarak tanımlanmıştır [230, 231].

Tanımlanan iki bağımsız değişkenin KLN üzerindeki etkileri CCD kullanılarak beş ayrı seviyeye (-  $\alpha$ , - 1, 0, 1, +  $\alpha$ ) kapsamlı bir şekilde analiz edilmiştir.  $\alpha$  değeri 1,44 olarak seçilerek tasarımın ortogonalitesi ve dönebilirliği korunmuştur. Metodolojinin doğruluğunu arttırmak için dört faktör noktası, dört eksen noktası ve merkezi noktanın beş tekrarı olmak üzere 13 deneme gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3'te formülasyonun özellikleri üzerinde etkili bağımsız değişkenlerin verilerine dair aralıklar verilmiştir.

**Tablo 3.3 :** Merkezi kompozit tasarım için seçilen parametreler.

Değişkenler	Değişken seviyeleri				
	-1.41	-1	0	1	1.41
A C888 (% a/h)	0.47	0.8	1.6	2.4	2.73
B P810 (% a/h)	0.23	0.4	0.8	1.2	1.37

DoE ve takibinde istatistiksel analizler için Design-Expert yazılımı kullanılmıştır. Deneysel çıktılarının belirlenmesi aşağıda yer alan denklem 3.2'de belirtilen kuadratik polinom denklemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir:

$$Y: \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_{12}AB + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 \quad (3.2)$$

Bu denklemde Y öngörülen yanıtı, A ve B bağımsız değişkenleri,  $A^2$  ve  $B^2$  ise etkileşimi ve ikinci dereceden bileşenleri ifade etmektedir. Akabinde  $\beta_0$  kesişme noktasını,  $\beta_1$  ve  $\beta_2$  lineer katsayıları,  $\beta_{12}$  etkileşim katsayısını,  $\beta_{11}$  ve  $\beta_{22}$  ise ikinci dereceden katsayıları temsil etmektedir.

Bağımsız değişkenlerin çıktılar üzerindeki etkisini belirlemek için  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilerek varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Ayarlanmış ve tahmini korelasyon katsayıları ( $r^2$ ) hesaplanarak uygulanan modelin uygunluğu değerlendirilmiştir.

Üç boyutlu yüzey grafikleri çizilmiş ve seçilen bağımsız değişkenlerin KLN dispersiyonunun özellikleri üzerine etkisi görselleştirilmiştir. En yüksek Kurkumin EE değerini ve en küçük partikül boyutunu sağlayan yanıtı içermek üzere optimum KLN formülasyonu seçilmiştir. Seçilen optimum KLN formülasyonu, üç tekrarlı olarak hazırlanmıştır. Bu formülasyonlardan alınan veriler, tahmin edilen verilerle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

**Tablo 3.4** : Merkezi kompozit tasarım matrisi.

Run	Değişkenler (% a/a)	
	A:C888	B:P810
1	0.8	1.2
2	1.6	0.8
3	0.47	0.8
4	1.6	0.8
5	1.6	0.8
6	0.8	0.4
7	2.4	1.2
8	2.4	0.4
9	1.6	1.37
10	1.6	0.8
11	1.6	0.23
12	1.6	0.8
13	2.73	0.8

### 3.2.3.2 Partikül boyutu, polidispersite indeksi ve zeta potansiyeli değerlerinin ölçümü

Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) cihazı ile 25 °C sıcaklık ve 173° açı koşulları sağlanarak formülasyonların partikül boyutu ve PDI değerleri ölçülmüştür [232]. Özelleştirilmiş bir küvet ve mikroeletroforez yöntemiyle zeta potansiyeli saptanmıştır. Ölçümler öncesinde formülasyonlar 1:100 oranında ultra saf su ile seyreltilmiştir. Her formülasyon için en az 3 kere ölçüm gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3.3 Enkapsülasyon etkinliği

Formülasyonların enkapsülasyon etkinliğinin belirlenmesi için santrifüj metodu seçilmiştir [233, 234]. Kurkumin ve Turmeron yüklü KLN formülasyonundan 1,5 ml alınarak 15.000 rpm'de 1 saat süresince santrifüj uygulanmıştır. Santrifüj neticesinde formülasyon pellet ve sıvı süpernatant olmak üzere iki faza ayrılmıştır. Her faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Süpernatant ve pellet örnekleri ACN ile seyreltilerek (1:100) hazırlanmıştır. Son olarak 3.2.1'de bahsedilen YBSK yöntemi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen süpernatantlar için enkapsülasyon etkinliklerinin tayinini gerçekleştirmek üzere aşağıdaki denklem 3.3 kullanılmıştır:

$$\% EE = \frac{\text{toplam etken madde miktarı} - \text{enkapsüle olmayan etken madde miktarı}}{\text{toplam etken madde miktarı}} * 100 \quad (3.3)$$

### 3.2.3.4 Katı lipit nanopartikül formülasyonlarındaki etken madde miktarı tayini

Optimum KLN formülasyonu içerisindeki etken madde (Kurkumin ve Turmeron) miktar tayininin gerçekleştirilmesi üzere, formülasyondan 200 µl örnek alınarak ACN ile tamamlanmıştır. Çalkalanarak içerisindeki lipitlerin ACN ile çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti, 0.45 µm por boyutuna sahip membran filtreden geçirilmiştir. 3.2.1’de bahsedilen YBSK yöntemi ile Kurkumin ve Turmeron miktarları tayin edilmiştir. Aynı işlem tekrarlanarak 3 tekrar halinde çalışılmıştır.

### **3.2.4 Katı lipit nanopartiküllerin morfolojik analizi**

Optimum KLN formülasyonunun morfolojik incelemesi çevresel taramalı elektron mikroskopu (Thermo Fisher Scientific, Quattro ESEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir [235]. Görüntüleme öncesinde KLN dispersiyonları deiyonize su ile seyreltilmiştir. Ardından birer damla alınarak karbon kaplı bakır ızgara üzerine damlatılmıştır. Oda sıcaklığında kuruması beklenmiştir. Kuruma sonrasında STEM modunda ve 30 kV’de çeşitli açılardan nanopartiküllerin görüntüleri alınmıştır.

### **3.2.5 Katı lipit nanopartikül formülasyonlarının stabilite çalışmaları**

Stabilite tayini için, formülasyonlar görsel olarak gözlemlenmiş ve 2 ay süresince 5 °C±3 °C’de muhafaza edilerek ölçümleri yapılmıştır [150]. Formülasyonlar; fiziksel görünüm, partikül boyutu, PDI değeri ve zeta potansiyeli olmak üzere çeşitli parametreler bakımından belirli zaman aralıklarında analiz edilmiştir. Analizler, üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.6 Katı lipit nanopartikül formülasyonundan in-vitro salım çalışması**

Etken maddeler Kurkumin’in ve Turmeron’un optimum KLN formülasyonundan *in-vitro* salımlarının analizi için diyaliz yöntemi seçilmiştir [236, 237]. Membran diyaliz yöntemi, *in-vitro* ilaç salımını araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [238].

Çalışma öncesinde diyaliz membran (Spectra/Por membran, 12-14 kDa) yarım saat süresince bidistile suda bekletilmiştir. KLN formülasyonundan 3 paralel örnek alınarak (10 ml) 3 farklı membran içerisine eklenmiştir. Diyaliz membranlar, standart klipsler ile kapatılmıştır. Ardından 75 mL fosfat tamponu: Tween 80 (19:1; pH 7.4) ortamı içeren beherler içerisine yerleştirilmiştir.

Reseptör fazın uçmasını önlemek adına beherlerin ağzı alüminyum folyo ve parafilm ile kapatılmıştır. Salım çalışması  $32 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ve 100 rpm/dk dönüş hızı sağlanarak çalkalayıcı inkübatörde gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, and 24. saatlerde) reseptör fazdan 0,5 mL örnekler alınarak aynı miktarda taze ortam ile tamamlanmıştır. Böylelikle sink koşulu sağlanmıştır. Salınan Kurkumin ve Turmeron miktarları valide edilmiş YBSK yöntemi ile tayin edilmiştir.

### **3.2.7 Üç boyutlu doku modeli EpiDerm™ ile in-vitro deri iritasyon çalışması**

Valide edilmiş ve epidermis eşdeğeri olarak istifade edilen EpiDerm™ ile *in-vitro* deri iritasyon testi çalışmaları gerçekleştirilmiştir [239, 240]. Bu çalışma, EpiDerm™ deri iritasyon testi için belirlenmiş koşulları takip eden OECD Test Kılavuzu 439'a dayanmaktadır [241]. Uygulama kapsamında incelenen parametreler arasında MTT testi neticesinde hesaplanan hücre canlılığı verileri bulunmaktadır.

#### **3.2.7.1 Maruziyet öncesi EpiDerm™ dokularının hazırlanması**

EpiDerm™ iritasyon testi protokolü dahilinde, teslim alındıktan sonra biyokabin içerisinde dokuları içeren Şekil 3.3'teki plaka açılmıştır. Şekil 3.4'teki üzere her bir dokuyu içeren insert, biyokabin içerisinde ve mikroskop altında tek tek kontrol edilmiştir. Bu aşamada, Şekil 3.4'te görüldüğü üzere dokuların bütünlüğü ve yüzeylerindeki nemlilik kontrol edilerek tüm insertlerin çalışmaya uygun şekilde bütünlüğünü koruduğu gözlemlenmiş ve plaka yeniden buzdolabına yerleştirilmiştir. Protokolde belirtildiği üzere doku kusurları, yüzeyinde aşırı nem görülen, yoğun olarak sıvı ile kaplanmış (yüzeyin % 40'ından fazla) kusurlu dokuları kullanılmaması gerekmektedir.



**Şekil 3.3 :** EpiDerm™ dokularını içeren plaka.



**Şekil 3.4 :** (A) Temin edilen EpiDerm™ dokularını içeren plakanın lot numarası. (B) Dokuya ait ilk mikroskop görüntüsü.

Şekil 3.5'te mevcut, EpiDerm™'ye özel besiyeri (EPI-100-NMM) oda sıcaklığına (20-25°C) getirilmiştir. Oda sıcaklığına ulaşan besiyeri, yeni ve steril 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 0.9 mL olacak şekilde eklenmiştir. Ardından teslim alındığı şekliyle plakada bulunan insertlerin altları steril gazlı beze silinerek, taze besiyeri eklenmiş olan 6 kuyucuklu plakaların üst sırasına yerleştirilmiştir.



**Şekil 3.5 :** EpiDerm™ dokularının besiyeri (EPI-100-NMM).

Kapağı kapatılan plaka, her bir insert dokusunun besiyeri ile temasını sağlamak adına yatay düzlemde dairesel hareketle yavaşça sallanmıştır. Böylelikle, insertlerin yeni plakaya yerleştirilmesi esnasında altlarında kalarak besiyerinin dokulara ulaşmasını engelleyebilecek hava kabarcıklarının giderilmesi hedeflenmiştir.

Yeni plakaya yerleştirilen insertlerin doku yüzeyleri steril eküvyon çubuklar ile nazikçe kurulanmıştır. İnkübatöre ( $37 \pm 1$  °C, %  $5 \pm 1$  CO<sub>2</sub>, 95 % RH) yerleştirilen dokular 60 dakika süresince bekletilmiştir. Bu süre sonunda inkübatörden alınan insertler, 6 kuyucuklu plakaların taze besiyeri eklenmiş olan alt sırasına aktarılmıştır.

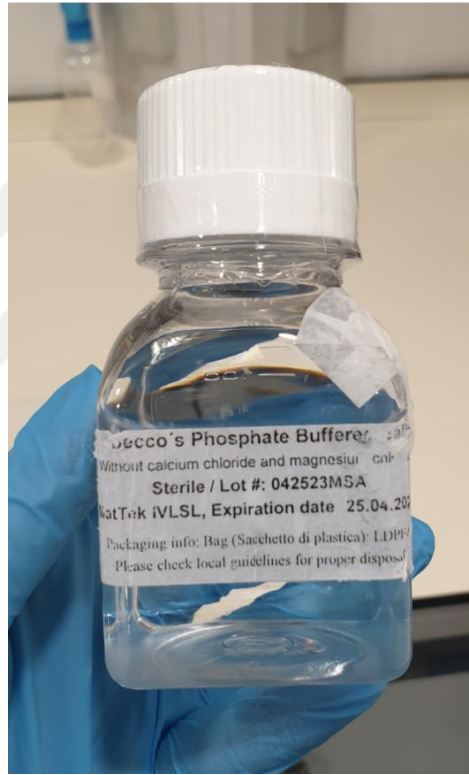
Doku yüzeyleri, yeniden steril eküvyon çubuklar ile kurulanmıştır. Daha sonra  $18 \pm 3$  saat kalmak üzere plaka inkübatöre ( $37 \pm 1$  °C, %  $5 \pm 1$  CO<sub>2</sub>, 95 % RH) yerleştirilmiştir [242]. Besiyeri ise buzdolabına ( $5 \pm 3$  °C) kaldırılmıştır.

### **3.2.7.2 Dozlama ve test maddelerine maruziyet**

Ertesi gün, besiyeri (EPI-100-NMM) buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına ( $20-25$  °C) getirilmiştir. Bu süre zarfında,  $18 \pm 3$  saatlik inkübasyon süresi tamamlanmıştır. Maruziyet uygulamasına başlamadan önce, yeni ve steril 6 kuyucuklu plakaların her kuyucuğuna 0.9 mL olacak şekilde besiyeri eklenmiş ve plakalar isimlendirilip numaralandırılmıştır.

Bu yeni plakalar inkübatöre yerleştirilip maruziyet uygulamasından 5 dakika önce, dokuları içeren plakalar ile birlikte biyokabine alınmıştır. Biyokabine alınan insertlerin doku yüzeylerindeki nem alınmış ve doku bütünlükleri kontrol edilmiştir. Çalışılmaya uygun şekilde bütün dokuların bütünlüklerini koruduğu doğrulanmıştır.

Ardından, maruziyet çalışmasına geçilmiş ve insert başına 30 µL olacak şekilde formülasyonlar ve test maddeleri dokulara uygulanmıştır. EpiDerm™ kiti dahilinde temin edilen % 5 konsantrasyonundaki sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi pozitif kontrol, Şekil 3.6'da mevcut steril Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) ile muamele edilen insertler ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.



**Şekil 3.6 :** EpiDerm™ kiti içerisindeki DPBS.

Uygulama grupları pozitif kontrol, negatif kontrol, Kurkumin+Turmeron, Kurkumin ve Turmeron yüklü KLN, boş KLN formülasyonu olarak belirlenmiştir.

- Negatif kontrol grubu (DPBS).
- Pozitif kontrol grubu (% 5 SDS)
- DMSO'da çözülmüş Kurkumin ve Turmeron
- Kurkumin ve Turmeron yüklü KLN

- Boş KLN

Dozlanan EpiDerm™ dokuları, 35 dakika süresince inkübatörde bekletilmiştir. Ardından inkübatörden çıkarılıp biyokabine yerleştirilerek maruziyet süresi 60 dakikaya tamamlanmıştır. 60 dakika süren maruziyet sonrası, insertlerde herhangi bir test maddesi veya formülasyon kalmış olması ihtimaline karşın her bir doku steril DPBS ile yıkanmıştır. İnsertler doldurulup boşaltılarak sürekli DPBS akışı altında yıkanmıştır. Bu basamak her insert için 15 kere tekrarlanmıştır. Bu işlem ile test maddelerinin dokulardan tamamen uzaklaştırılması hedeflenmektedir. Sonrasında insertler, DPBS dolu behere daldırılarak beher içinde dairesel hareketle yıkanmıştır. Bu işlem her bir insert için 3 kere tekrarlanmıştır. Böylelikle olası kalıntıların uzaklaştırılması hedeflenmiştir.

Son olarak ise, her insert için DPBS ile içeriden ve dışarıdan 1 kere olmak üzere son yıkama gerçekleştirilmiştir. Biyokabin içerisinde insertler nazikçe sallanarak DPBS kalıntıları uzaklaştırılmıştır. 6 kuyucuklu yeni plakanın üst sırasına 0.9 mL taze besiyeri konulmuştur. Altları steril gazlı beze silinen dokular, yeni plakanın üst sırasına yerleştirilmiştir. Doku yüzeyleri, steril eküvyon çubuklar ile kurulmuştur. Bu aşamalar, tüm insertler için tek tek ve hassasiyetle gerçekleştirilmiştir.

Kurulama işlemi gerçekleştirilen dokular, 24 saat beklemek üzere inkübatöre yerleştirilmiştir.

### **3.2.7.3 MTT canlılık testi**

24 saat süren inkübasyonu takiben, 24 kuyucuklu yeni bir plaka isimlendirilmiş ve numaralandırılmıştır. Dokular, uygulama grupları dikkate alınarak mikroskopta incelenmiştir. Donmuş konsantre MTT mediumu buzluktan çıkarılarak çözünmesi beklenmiştir. 24 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 300 µL olacak şekilde hazırlanan taze MTT ajanı eklenmiştir.

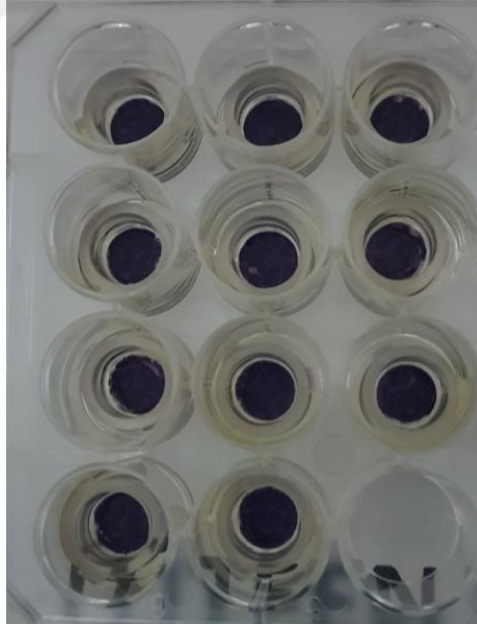
İnkübatörden çıkarılmış 6 kuyucuklu plakalardan alınan doku insertlerinin altı steril gazlı bez ile silinmiştir. İnsertler tek tek MTT ajanı ekli yeni 24 kuyucuklu plakaya yerleştirilmiştir. Bu plaka, 3 saat beklemek üzere inkübatöre ( $37 \pm 1$  °C,  $\% 5 \pm 1$  CO<sub>2</sub>, 95 % RH) yerleştirilmiştir.

3 saatlik MTT inkübasyonunun ardından, her bir insertin bulunduğu kuyucuktaki MTT mediumu pipet ile uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklar, DPBS ile doldurulup boşaltılarak

dokular yıkanmıştır. İkişer defa tekrar edilen bu işlemin ardından doku yüzeyleri kurulanmıştır.

Dokular buldukları kuyucuklardan çıkarılarak altları steril gazlı bez ile silinmiş ve 24 kuyucuklu ekstraksiyon plakasına aktarılmıştır. Özütleyici mahiyetinde doku başına 2 mL izopropanol kuyucuklara eklenmiştir. EpiDerm™ dokularının tamamen izopropanol ile kaplı olmasına dikkat edilmiştir. Plakanın kapağı kapatılarak ışık görmemesi için plaka alüminyum folyo ile sarılmıştır. İzopropanolün uçmasını önlemek adına kilitli torba içerisine konulmuştur. Böylelikle MTT ile oluşan mavi formazan tuzlarının izopropanol içerisinde çözündürülmesi amaçlanmıştır. İzopropanol burada özütleyici çözelti vazifesi görmüştür.

Kilitlenebilir poşete yerleştirilen plaka, oda sıcaklığında 120 rpm hızında ve 2 saat süresince çalkalayıcı inkübatörde bekletilmiştir. Bu süre sonunda, özütleme işleminin her bir doku için gerçekleştiğinden emin olunmuştur. Doku insertleri çıkarılarak atılmıştır. Şekil 3.7’de gösterildiği üzere plakada her bir dokunun özütü kalmıştır.



**Şekil 3.7 :** EpiDerm™ dokularını özütleme aşamasının ardından plakada kalan her bir dokunun özütüne ait görüntüler.

Sonrasında, özütleme sıvısı 3 kere pipetajlanarak homojen bir şekilde karıştığından emin olunmuştur. Son aşamada ise, her doku özütünden ikişer adet 200  $\mu$ L örnek alınarak 96 kuyucuklu plakaya eklenmiştir. 570 nm’de spektrofotometre kullanılarak formazan kristallerinin optik yoğunluğu tespit edilmiştir [243].

Formülasyonun, aynı konsantrasyondaki Kurkumin + Turmeron'un ve kontrol gruplarının olası irritasyon seviyeleri ise maruz kalan dokuların canlılığındaki düşüş doğrultusunda değerlendirilmiştir.

### **3.2.8 İstatistiksel analiz**

Deneyle minimum 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiş olup veriler ortalama  $\pm$  standart sapma (SS) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve post-hoc karşılaştırmalar Tukey's HSD testini içermektedir.  $p < 0.05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Deri irritasyon testi için başlangıç absorbans verilerinden boş optik yoğunluk (OD) değerleri çıkarıldıktan sonra her test için ortalama OD ve standart sapma hesaplanmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan maruz bırakılmamış dokuların optik yoğunluğunun ortalaması % 100 canlılık olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar her bir insert için negatif kontrol ile ilişkili ve standart sapma (SS) ile birlikte canlılık yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

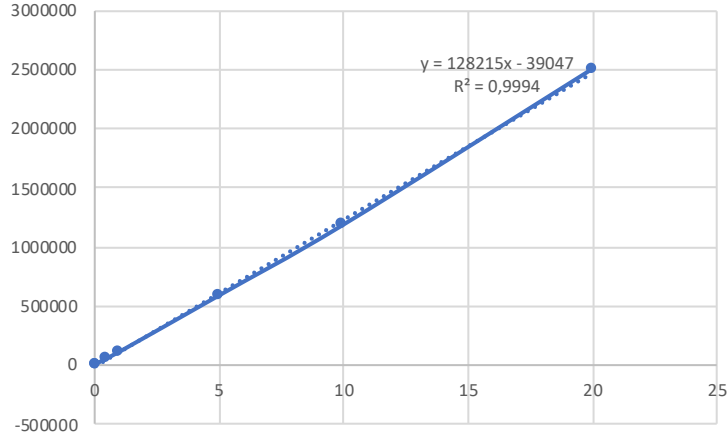
## **4. BULGULAR VE TARTIŞMA**

### **4.1 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Yöntemi**

#### **4.1.1 Aktif bileşenlerin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile standart doğrularının çizilmesi**

3.2.1’de belirtildiği üzere YBSK yöntemi ile Kurkumin ve Turmeron için miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Çeşitli denemeler sonucunda; piklerin şekli ve geliş zamanları göz önünde bulundurularak Kurkumin için ACN: fosfat tamponu (80:20), Turmeron için ise ACN: % 0,4 (h/h) asetik asit içeren ultra saf su (45:55) mobil faz olarak seçilmiştir. Akış hızı dakikada 1 mL olarak belirlenmiştir.

YBSK ile miktar tayininde kullanılmak üzere etken madde Kurkumin’in ve Turmeron’un standart doğrularının çizilmesi için ACN ile stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden gerekli seyreltmeler yapılarak belirli konsantrasyonlara sahip numuneler hazırlanmıştır. Ardından, her bir konsantrasyon ve numuneye karşılık gelen alan değeri kaydedilmiştir. Şekil 4.1’de Kurkumin için ve Şekil 4.2’de ise Turmeron için elde edilen standart doğrulara dair grafikler gösterilmiştir.



**Şekil 4.1 :** Kurkumin'e ait standart eğrisi ve denklemini.

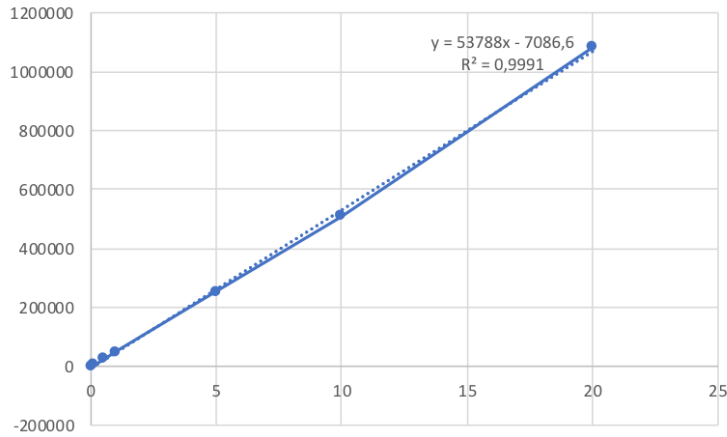
denklem 4.1'de yer alan Kurkumin'e ait standart eğrisinin denklemini:

$$y = 128215x - 39047 \quad (4.1)$$

y = Eğri altında kalan alan

x = konsantrasyon ( $\mu\text{g/ml}$ )

Determinasyon katsayısı  $r^2 = 0,9994$  olarak bulunmuştur.



**Şekil 4.2 :** Turmeron'a ait standart eğrisi ve denklemini.

denklem 4.2'de yer alan Turmeron'a ait standart eğrisinin denklemini:

$$y = 53788x - 7086,6 \quad (4.2)$$

y = Eğri altında kalan alan

x = konsantrasyon ( $\mu\text{g/ml}$ )

Determinasyon katsayısı  $r^2 = 0,9991$  olarak bulunmuştur.

Çeşitli ayırma mekanizmalarını ve yöntemlerini kapsayan YBSK, kantitatif ve kalitatif analizler için önemli bir tekniktir [244]. Halihazırda Kurkumin ve Turmeron için basit, hızlı, doğru, hassas, kesin ve spesifik bir kantitatif tayin gerçekleştirmek üzere YBSK yöntemine başvuru yapılan çalışmalar bulunmaktadır [245-250].

Li ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada mobil faz olarak ACN kullanılarak Kurkumin tayini için hızlı, duyarlı ve spesifik bir YBSK-UV yöntemi geliştirilmiştir [248]. Yapılan bir başka çalışmada ise metanol-su, ACN-su, ACN-asit sulu çözeltisi olmak üzere farklı mobil fazlar denenmiş ve daha iyi bir çözünürlük sağladığı için ACN ve asetik asit (% 0,4) çözeltisi nihai mobil faz olarak seçilmiştir [251].

## **4.2 Miktar Tayini Yönteminin Analitik Validasyonuna Ait Bulgular**

### **4.2.1 Doğrusallık**

Doğrusallık analizleri yapılmak üzere, yöntem 3.2.1.1’de anlatıldığı şekilde etken madde Kurkumin’in ve Turmeron’un stok çözeltileri hazırlanarak 0,05 ile 20 µg/mL konsantrasyon aralığında standart doğrular oluşturulmuştur. Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de elde edilen standart doğrular ve determinasyon katsayıları gösterilmektedir. Yapılan analizler neticesinde, pik alanları ile 0,05–20 µg/ml aralığındaki Kurkumin ( $r^2=0,9994$ ) ve Turmeron ( $r^2=0,9991$ ) konsantrasyonları arasında doğrudan bir korelasyon olduğu saptanmıştır.

### **4.2.2 Doğruluk ve geri elde edilebilirlik**

Kurkumin ve Turmeron için ACN içerisinde; konsantrasyonları 20, 10 ve 5 µg/ml olmak üzere 3 farklı örnek hazırlanmıştır. Hazırlanan örnekler, Kurkumin için 420 nm ve Turmeron için 240 nm dalga boyunda YBSK sistemi ile arka arkaya 6 kez okutulmuştur. Ölçümlerden elde edilen eğri altı alan değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri, standart doğruların denklemleri yardımıyla hesaplanmıştır. Hesaplanan konsantrasyon değerlerinden % geri elde değerleri Yöntem 3.2.1.2’de belirtildiği şekilde hesaplanmıştır. Veriler, aşağıdaki Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.

**Tablo 4.1 : Kurkumin'e ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik değerleri.**

Örnek No	(20 µg/ml)		(10 µg/ml)		(5 µg/ml)	
	Hesaplanan Değer	% Geri Elde	Hesaplanan Değer	% Geri Elde	Hesaplanan Değer	% Geri Elde
1	20,09	100,45	9,9	99,07	4,92	98,42
2	19,59	97,98	10,00	100,07	4,95	99,09
3	20,07	100,37	9,80	98,04	4,98	99,64
4	19,63	98,17	9,88	98,89	5,04	100,92
5	19,71	98,56	9,56	95,66	5,03	100,65
6	19,86	99,34	9,85	98,56	5,03	100,78
ORT		99,15		98,38		99,92
SS		1,08		1,49		1,02
BSS		1,09		1,51		1,02

**Tablo 4.2 : Turmeron'a ait doğruluk ve geri elde edilebilirlik değerleri.**

Örnek No	(20 µg/ml)		(10 µg/ml)		(5 µg/ml)	
	Hesaplanan Değer	% Geri Elde	Hesaplanan Değer	% Geri Elde	Hesaplanan Değer	% Geri Elde
1	19,62	98,12	10,22	102,23	4,94	98,7
2	20,03	100,13	10,05	100,54	5,01	100,12
3	19,96	99,82	9,92	99,15	4,91	98,11
4	20,43	102,15	9,84	98,35	5,07	101,45
5	20,24	101,21	9,98	99,78	5,07	101,4
6	19,69	98,46	9,91	99,12	5,05	100,94
ORT		99,98		99,86		100,12
SS		1,55		1,37		1,42
BSS		1,55		1,37		1,41

### 4.2.3 Kesinlik

#### 4.2.3.1 Tekrar edilebilirlik

Tekrar edilebilirlik için, yöntem 3.2.1.3.1'de detaylıca belirtildiği üzere 5 µg/mL konsantrasyona sahip çözeltinin eğri altı alan değeri YBSK sistemi ile ard arda 6 kez ölçülmüştür. Tablo 4.3'te ve Tablo 4.4'te gerçekleştirilen ölçümlerde okunan eğri altı alanlarına dair hesaplanan ORT, SS ile % BSS değerleri belirtilmiştir.

% BSS değerinin 2'den az olması yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.3 : Kurkumin için tekrar edilebilirlik değerleri.**

Örnek No	(5 µg/ml)
1	591943
2	596250
3	599750
4	607979
5	606207
6	607050
ORT	601529,833
SS	6586,22348
BSS	1,094912

**Tablo 4.4 : Turmeron için tekrar edilebilirlik değerleri.**

Örnek No	(5 µg/ml)
1	252134
2	250237
3	251492
4	248102
5	253122
6	255097
ORT	251697,3
SS	2403,3
BSS	0,954837

#### 4.2.3.2 Tekrar elde edilebilirlik

Tekrar elde edilebilirlik için, Yöntem 3.2.1.3.2’de detaylıca belirtildiği üzere aynı konsantrasyona (5 µg/ml) sahip altı adet çözeltinin eğri altı alan değeri ölçülmüştür. Bu alanlara karşılık gelen konsantrasyon değerlerine ait ORT, SS ve BSS değerleri hesaplanmıştır. Değerler Tablo 4.5’te ve Tablo 4.6’da belirtilmiştir.

Hesaplanan % BSS değerinin % 2’den az olması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

**Tablo 4.5 : Kurkumin için tekrar elde edilebilirlik değerleri.**

Örnek No	(5 µg/ml)
1	557441
2	555823
3	569793
4	572687
5	571111
6	572517
ORT	566562
SS	7779,83514
BSS	1,373166

**Tablo 4.6 :** Turmeron için tekrar elde edilebilirlik değerleri.

Örnek No	(5 µg/ml)
1	254121
2	256205
3	250231
4	249127
5	251940
6	248901
ORT	251754,167
SS	2926,05375
BSS	1,16226627

#### 4.2.4 Özgünlük, seçicilik

Etken madde içeren ve içermeyen formülasyonlar uygun çözücülerde çözündürülerek 420 ve 240 nm dalga boyunda YBSK grafikleri incelenmiştir. Etken madde içermeyen formülasyonlarda Kurkumin ve Turmeron piklerinin görüldüğü noktalarda herhangi bir pik görülmemiştir. Böylelikle yöntemlerin Kurkumin'e ve Turmeron'a özgü olduğu saptanmıştır.

#### 4.2.5 Teşhis ve tayin sınırları (LOD ve LOQ)

Etken maddelere ait teşhis sınırı ve tayin sınırı değerlerinin ölçümü için Yöntem 3.2.1.5'te anlatıldığı şekilde çalışılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.7'de ve 4.8'de gösterilmektedir.

**Tablo 4.7 :** Etken madde Kurkumin'e ait teşhis sınırı ve tayin sınırı değerleri.

µg/ml	ACN
<b>LOD</b>	0,0185 ± 0,0001
<b>LOQ</b>	0,0609 ± 0,0006

**Tablo 4.8 :** Etken madde Turmeron'a ait teşhis sınırı ve tayin sınırı değerleri.

µg/ml	ACN
<b>LOD</b>	0,0156 ± 0,0006
<b>LOQ</b>	0,0474 ± 0,002

### 4.3 Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonunun Geliştirilmesi

#### 4.3.1 Katı lipit nanopartikülün deneysel tasarımı ve optimizasyonu

KLN formülasyonları, Yöntem 3.2.2'de detayları belirtildiği üzere yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Olası metal kontaminasyonunu önlemek adına işlem süreleri kısa tutulmuştur.

Katı lipid olarak mono, di ve trigliseritlerin karışımı olan C888 seçilmiştir. Yüzey aktif madde olarak ise iyonik-olmayan P810 kullanılmıştır.

Mikroemülsiyon, çözücü emülsifikasyon-buharlaştırma ve yüksek basınçlı homojenizasyon gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında; lipid içeriği yüksek olan formülasyonların üretimi için yüksek devirli homojenizasyon yöntemi daha elverişlidir [252].

Literatürde, C888 ile hazırlanmış çok sayıda KLN içeren çalışmanın bulunduğu görülmüştür. Ayrıca diğer formülasyonlara kıyasla C888 içeren nanopartiküllerin ilaç yükleme ve salım özelliklerinin daha iyi olduğu ifade edilmiştir [253].

Hazırlanan nihai formülasyonun RhE modeli Epiderm™ ile gerçekleştirilen in-vitro deri irritasyon çalışması esnasında toksisite riski taşımaması adına çevre dostu ve deri ile uyumlu bir yüzey aktif madde olan P810 seçilmiştir [254, 255].

DoE; karmaşık deneyleri düzenlemek, deneysel verileri analiz etmek üzere kullanılan matematiksel ve istatistiksel bir yöntemdir [256]. Deneysel tasarımlar, farklı değişkenlerin göreceli anlamlılığına dair tahminler sağlayan formülasyon süreçlerini optimize etmek adına da yararlı araçlardır [227].

YYM, ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi sırasında optimum formülasyonun oluşturulması için işlem değişkenlerinin eşzamanlı olarak analiz edilmesinde yüksek güvenilirlik göstermektedir [227].

İstatistiksel bilgisayar yazılımları ile desteklenebilen YYM, farmasötik formülasyonların geliştirilmesinde ve optimizasyonunda iyi tasarlanmış birkaç deneyden azami düzeyde veri elde edilmesini sağlamaktadır. Sıklıkla başvuru olan YYM yöntemlerinden biri olarak CCD, gerekli en az sayıda deney ile araştırmaya ve önceden belirlenmiş hedefe ulaşmaya yönelik en uygun bileşimin seçilmesine olanak tanıyarak farmasötik formülasyonların hazırlanması sırasında karşılaşılan sorunlara etkin şekilde çözüm sunmaktadır [257].

YYM, çok sayıda değişken oldukça fazla sayıda deney yapılmasını gerektirdiğinde kayıp verilerden etkilenmeden sonuçları doğru bir şekilde tahmin etme yeteneğine sahiptir. Ayrıca YYM uygulaması, yanıt değerini etkileyen farklı değişkenler arasındaki etkileşimi eş zamanlı olarak belirleyebilmektedir. YYM kullanılarak elde edilen verilerin başarılı ve güvenilir şekilde tahmin kabiliyeti gösterdiği ifade edilmiştir [256].

Priyanka ve ark. CCD yöntemini kullanarak *Ficus religiosa L.* özütü yüklü KLN'nin optimizasyonunu gerçekleştirmiştir. Çalışılan faktörler arasında homojenizasyon hızı ve süresi, sonikasyon süresi ve yoğunluğu, yanıtlar arasında ise ortalama partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerleri bulunmaktadır. Optimizasyonu gerçekleştirilen seri başarılı bir şekilde hazırlanmış ve ortalama partikül boyutu 180 nm, PDI değeri ise 0.317 olarak ölçülmüştür [258].

Prabhu ve ark. değişen konsantrasyonlarda katı lipit (gliserol monostearat) ve yüzey aktif madde (Tween 80) içeren Kurkumin yüklü KLN formülasyonları geliştirmiştir. Geliştirilen KLN'lerin ortalama partikül boyutu 134,5 ile 203,3 nm aralığında, PDI değeri ise 0,289 ile 0,415 aralığında bulunmuştur. Optimize edilmiş formülasyonun partikül boyutu ve PDI değerleri ise sırasıyla  $134,5 \pm 0,85$ , ve  $0,393 \pm 0,04$  olarak bulunmuştur. KLN'lerin kabul edilebilir düzeyde homojeniteye ve partikül büyüklüğüne sahip olması, gliseril monostearatın Tween 80 ile optimum düzeyde etkileşime girerek KLN'ye hedeflenen etkinliği ve verimliliği sağlamasına atfedilmiştir [259].

Etodolak yüklü topikal KLN geliştirilmesi amaçlanan bir çalışmada da optimizasyon için CCD kullanılmıştır. Çalışılan faktörler stearik asit konsantrasyonu ve lesitinin etkisi iken yanıtlar ortalama partikül boyutu ve EE değerleri olarak belirlenmiştir. Design Expert yazılımı aracılığı ile formülasyon optimize edilmiştir. 402 ile 684 nm arasında değişen partikül boyutuna sahip KLN'ler elde edilmiştir. EE değeri % 74,18 ile % 80,30, zeta potansiyeli değeri ise -19 ile -24 mV arasında bulunmuştur. Bu değerler, optimize edilen KLN'nin Etodolak için yüksek oranda EE sunduğunu ve stabilitenin devamlılığı için yeterli zeta potansiyelini sağladığını göstermektedir [260].

Bir diğer çalışmada ortalama partikül boyutunu,  $\alpha$ - tokoferol geri kazanım oranını ve zeta potansiyelini optimize etmek üzere YYM kullanılarak  $\alpha$ - tokoferol içeren KLN ( $\alpha$ - tokoferol-KLN) geliştirilmiştir. KLN'lerin optimizasyonu, morfolojik inceleme ve fiziksel stabilite analizleri ile karakterize edilmiştir. Optimize edilmiş  $\alpha$ - tokoferol-KLN için partikül boyutu,  $\alpha$ - tokoferol geri kazanım oranı ve zeta potansiyeli değerleri sırasıyla 214,5 nm, % 75,4 ve - 41,9 mV olarak bulunmuştur. Ayrıca formülasyon, 6 °C'de 21 gün boyunca stabilitesini korumuştur [261].

#### 4.3.1.1 Bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon etkinliği üzerine etkisi

Hazırlanan 13 farklı formülasyonun çıktıları CCD matrisi ile birlikte Tablo 4.9'da sunulmuştur. KLN dispersiyonları, Kurkumin için % 48,39 ile % 90,97 aralığında değişen EE göstermiştir. EE yanıtları aşağıda mevcut ikinci dereceden denklem 4.3 kullanılarak saptanmıştır.

$$R1: 67.53 + 11,83A + 8.71B - 7.97AB + 2.32A^2 - 3.02B^2 \quad (4.3)$$

**Tablo 4.9 :** Merkezi kompozit tasarım matrisi ve KLN için elde edilen yanıtlar.

Run	Değişkenler(% (a/a))		Yanıtlar	
	A: C888	B: P810	Partikül Boyutu (nm)	Enkapsülasyon Etkinliği (%)
1	0.8	1.2	230.9	72.43
2	1.6	0.8	320.3	64.98
3	0.47	0.8	207.8	53.48
4	1.6	0.8	345.6	69.26
5	1.6	0.8	353.8	68.93
6	0.8	0.4	205.1	40.26
7	2.4	1.2	224.4	77.30
8	2.4	0.4	211.3	77.03
9	1.6	1.37	227.4	74.72
10	1.6	0.8	338.7	69.42
11	1.6	0.23	229.4	48.39
12	1.6	0.8	327.4	65.04
13	2.73	0.8	203.8	90.97

Regresyon modelinin EE (R1) için tahmin gücünü değerlendirirken, sırasıyla C888 ve P810 olarak kodlanmış parametreler (A ve B) dikkate alınmıştır. Tablo 4.10'da sunulan analiz sonuçları, modelin istatistiksel anlamlılığına dair ikna edici kanıtlar ortaya koymaktadır.

**Tablo 4.10 :** Kurkumin'in enkapsülasyon etkinliği için ANOVA sonuçları.

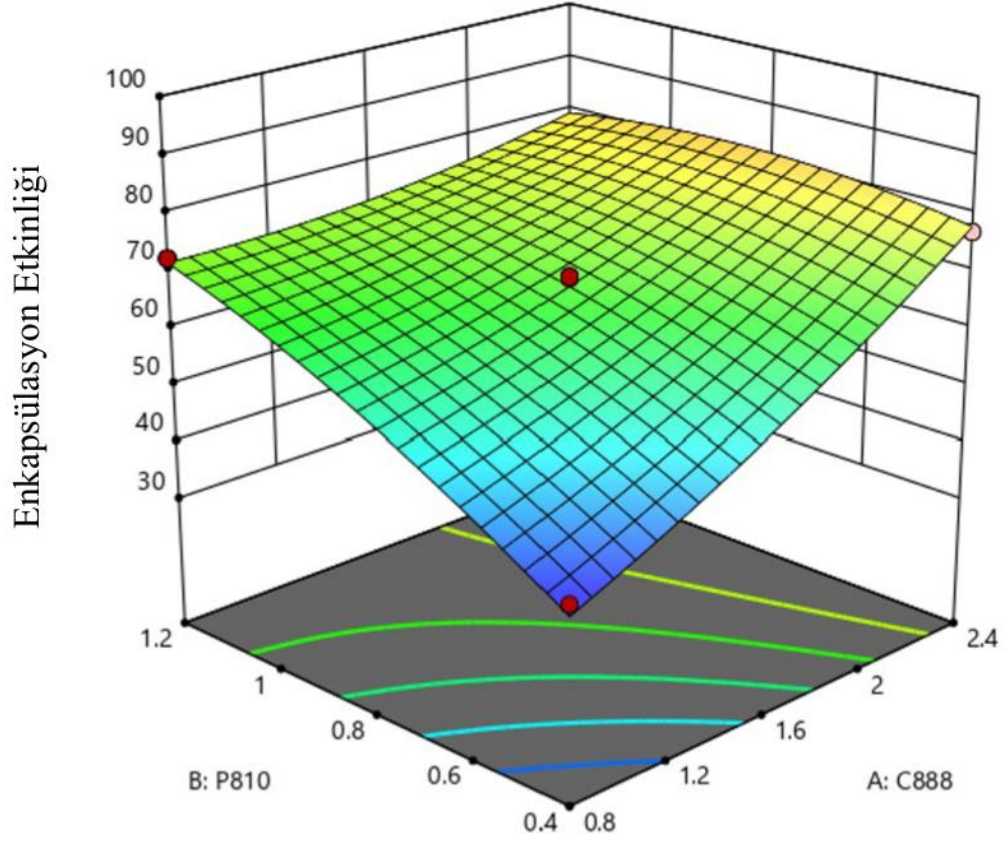
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Model	2096.66	5	419.33	72.79	< 0.0001	significant
A-C888	1120.04	1	1120.04	194.43	< 0.0001	
B-P810	606.85	1	606.85	105.34	< 0.0001	
AB	254.40	1	254.40	44.16	0.0003	
A <sup>2</sup>	37.31	1	37.31	6.48	0.0384	
B <sup>2</sup>	63.41	1	63.41	11.01	0.0128	
Residual	40.32	7	5.76			
Lack of Fit	19.10	3	6.37	1.20	0.4168	not significant
Pure Error	21.23	4	5.31			
Cor Total	2136.98	12				

72,79 olan F değeri ve 0.0001'in altında oldukça düşük olan P değeri, modelin Kurkumin için EE değerini tahmin etmede oldukça güvenilir olduğunu ve modelin sunduğu denklemin istatistiksel olarak anlamlılığını göstermektedir. İlave olarak, P değeri 0,417 olan uyumsuzluk değeri de modelin verilere yeterince uyum sağladığı fikrini desteklemektedir.

Özellikle 0,9811 değerindeki determinasyon katsayısı ( $r^2$ ) dikkat çekicidir ve yanıtlardaki (Kurkumin için EE) değişkenliğin yaklaşık % 98,1'inin bu regresyon modeliyle açıklanabileceğini göstermektedir. Buna ek olarak, sırasıyla 0,9677 ve 0,9209 değerindeki düzeltilmiş ve öngörölmüş  $r^2$  değerleri, modelin güvenilirliğini bir kez daha vurgulamaktadır. Her ikisi de 0,9'u aşan bu iki değer, gözlenen ve tahmin edilen veriler arasında yüksek derecede bir uyumluluk olduğunu göstermektedir. Değerler arasındaki farkın 0,2'den az olduğu düşünöldüğünde bu uyum düzeyi oldukça önemlidir. ANOVA analizinin sonuçları ve ilgili regresyon değerleri, modelin Kurkumin'e ait EE değerini doğru bir şekilde tahmin etme başarısını göstermektedir.

Tablo 4.10'da sunulan ANOVA analizinden elde edilen sonuçlar, KLN formölasyonundaki katı lipit ve yüzey aktif madde miktarlarındaki ayarlamaların Kurkumin'in EE üzerinde belirgin bir etkisinin olduğunu göstermektedir. ( $p < 0,05$ )

Bağımsız değişkenlerin sonuç üzerindeki etkilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmek adına yaygın olarak kabul gören bir yaklaşım olan ve Şekil 4.3'te verilen 3B yanıt yüzey grafikleri kullanılmıştır. Şekil 4.3'te gösterildiği üzere yanıt yüzey grafiği, katı lipit seviyesinin yükseltilmesinin EE üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığını göstermektedir.



**Şekil 4.3** : KLN'nin Kurkumin için enkapsülasyon etkinliği değerlerine ait üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.

Bu olgu, lipofilik ilaç moleküllerinin lipit matrisi ile etkileşime girmesi için daha fazla olanak sağlayan katı lipit miktarının artması ile izah edilebilmektedir. Netice olarak, katı lipit miktarındaki artış lipofilik ilaçların lipit nanopartiküller içerisinde kapsüllenmesi ve tutulması için daha elverişli bir ortam sağlamaktadır. İlave olarak, daha yüksek miktarlarda katı lipit ile taşıyıcı sistemin viskozitesinde gözlenen artışın da bu gelişmede rol oynaması muhtemeldir. Viskozitenin artması, partiküllerin daha hızlı katılaşmasına yol açarak ilacın reseptör faza difüzyonunu kısıtlamaktadır [262, 263].

Çalışmamız, artan yüzey aktif madde miktarının da EE'yi olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Bunun başlıca sebebi, artan yüzey aktif madde konsantrasyonunun arayüzey gerilimini azaltarak ve agregasyonu önleyerek KLN'nin stabilitesinin iyileşmesine katkıda bulunmasıdır. Stabil nanopartiküller hidrofobik ilacın tutulmasında daha başarılı etkinlik göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, EE değerini arttırmak üzere KLN formülasyonlarındaki katı lipit ve yüzey aktif madde miktarlarının optimize edilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Mükemmel yapıya sahip düzenli partiküller oluşturan lipitler ilacın dışarı atılmasına yol açarken mono, di ve trigliseritlerin karışımı olan C888 gibi karmaşık lipitler ise muntazam olmayan daha az düzenli yapılar oluşturarak Kurkumin'in yerleşebileceği alanlar sunmaktadır. C888'in lipofilik bir bileşik olan Kurkumin'in enkapsülasyonunu destekleyen bir diğer özelliği ise trigliseritlere bağlı uzun zincirli yağ asitleri nedeniyle hidrofobik özelliğinin yüksek olmasıdır [253].

C888; mono, di ve trigliserit içeren bileşimi nedeniyle lipit fazı olarak etken maddenin dışarı atılmasını önleyen ve yüksek EE sunan birçok kristal kusuruna ve düzensizliğine sahiptir [264]. Beş farklı katı lipit üzerine yapılan bir araştırmada; C888 ve Precirol® ATO 5 sırasıyla yaklaşık % 0,6 ve % 0,7 (a/a) olmak üzere en yüksek Kurkumin çözünürlüğü sunan katı lipitler iken Dynasan® 118, setil palmitat ve Imwitor® 960K'nin Kurkumin'i çözemediği bulunmuştur [265].

Devin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Noskapin yüklü KLN hazırlanmış ve lipofilik özellikteki ilacın EE'sinin katı lipit miktarının artmasıyla birlikte artış gösterdiği tespit edilmiştir [266]. Bir başka çalışmada lipit konsantrasyonundaki artış, ilacın çözünmesi için daha fazla iç faz oluşturarak ilacın elverişsiz ortamda dağılmasına imkan vermiş ve yüksek EE değeri sağlamıştır [233].

% 2 ve % 3 (a/a) Kurkumin içeren KLN geliştirilmiş fakat Kurkumin miktarının yüksek olması, lipit partiküllerinin dışında kristalleşmesine ve dolayısıyla enkapsülasyonunun düşük olmasına yol açmıştır. Bu sonuç, oda sıcaklığındaki lipitin ilaç çözünürlüğünün düşük olması ile KLN matriksi içinde meydana gelen ve ilacın dışarı atılmasıyla birlikte sınırlı ilaç yüklemesinden sorumlu olan lipitlerin yeniden kristalleşmesi ve polimorfik geçişleri ile ilişkilendirilmektedir [267].

Yapılan bir çalışmada; iki farklı katı lipit ile hazırlanan KLN formülasyonlarının stabilitesi karşılaştırılmıştır. Gliseril behenat (C888) ile üretilen boş ve Kurkumin yüklü KLN formülasyonları; partikül boyutunda sapma olmaması, EE ve ilaç yükleme kapasitesi değerlerinin değişmemesi sureti ile incelenen süre boyunca iyi düzeyde depolama stabilitesi göstermiştir. Aksine, gliseril palmitostearat (Precirol® ATO 5) içeren Kurkumin yüklü KLN formülasyonlarının 4 hafta sonunda boyut özelliklerini koruyamadığı görülmüştür. C888 gibi daha uzun zincirli yağ asidi içeren lipitlere kıyasla Precirol® ATO 5'te meydana gelen modifikasyonların, lipitin fiziksel

özelliklerinin ve dolayısıyla stabilitesinin büyük ölçüde bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir [265].

Yüzey aktif maddeler, KLN'lerin hazırlanması esnasında emülsifikasyon işleminde önemli bir göreve sahiptir. Başarılı bir emülsifikasyon süreci; daha fazla yüzey alanına sahip, daha küçük ve homojen nanopartiküllerle sonuçlanarak etkin bir ilaç enkapsülasyonu için daha fazla imkân sağlamaktadır [268, 269].

Shrotriya ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, lipit ve yüzey aktif madde miktarları değiştirilerek dokuz farklı Kurkumin yüklü KLN geliştirilmiştir. En yüksek EE değeri, lipit miktarının orta konsantrasyonunda ve en yüksek yüzey aktif madde konsantrasyonunda kaydedilmiştir. Böylelikle yüzey aktif madde miktarının EE üzerinde kayda değer bir pozitif etkisinin olduğu tespit edilmiştir [233].

Öte yandan bir başka çalışmada; yüzey aktif madde miktarı sabit tutulup lipit miktarı değiştirilerek hazırlanan kurkuminoid yüklü KLN'lerin EE değerleri incelenmiştir. Sonuçlar, lipit miktarı arttıkça EE değerinin azaldığını göstermiştir. Kurkuminoidlerin seçilen yağ fazı stearik asit içerisinde çözünmemesi bunun sebebi olarak düşünülmüştür. Kurkuminoidlerin KLN yüzeyindeki yüzey aktif madde tabakasına dahil olmasının ise EE değerinin yükselmesini sağladığı düşünülmüştür. Lipit konsantrasyonunun yüksek olmasına karşın partikül yüzeyindeki toplam kurkuminoid miktarını çözündürmek için yüzey aktif madde miktarının yetersiz kalması, EE değerinin düşük olması ile sonuçlanmıştır [270].

Enkapsüle edilen biyoaktif maddenin lipofilik veya hidrofilik özelliği, yüksek bir EE değeri elde etmek üzere önemli bir faktördür. Bu nedenle KLN, Kurkumin gibi hidrofobik ve dolayısıyla klinikte kullanımını sınırlı olan ilaçlar için biyoyararlanımın ve hedefli taşımanın iyileştirilmesi için önemli bir role sahiptir. Çalışmamızda, Kurkumin'in lipofilik yapısı nedeniyle % 98'e varan bir EE değeri elde edilmiştir [271].

#### **4.3.1.2 Bağımsız değişkenlerin partikül boyutu üzerine etkisi**

Partikül boyutunun küçülmesi ile derinin alt tabakalarına ulaşabilecek ilaç miktarının artacağı düşünülmektedir [272]. Bu sebeple nanopartikül boyutları dikkatle incelenmiş ve hazırlanan formülasyonların mümkün olduğunca küçük partikül boyutuna sahip olması hedeflenmiştir.

KLN dispersiyonlarının partikül boyutu analizi, Tablo 4.9'da belirtildiği üzere 203,8 ile 353,8 nm arasında değişen bir boyut aralığı ortaya koymuştur. Bu sonuçları modellemek için aşağıda verilen ikinci dereceden denklem 4.4 kullanılmıştır:

$$R2: 337.16 - 0.732A + 4.52B - 3.2AB - 65.48A^2 - 54.18B^2 \quad (4.4)$$

Mevcut çalışmada partikül boyutu (R2), sırasıyla C888 ve P810'a karşılık gelen A ve B olarak ifade edilmiş parametrelerin bir fonksiyonu olarak incelenmiştir. Regresyon modelinin partikül boyutu (R2) için tahmin gücünü değerlendirirken, sırasıyla C888 ve P810 olarak kodlanmış parametreler (A ve B) dikkate alınmıştır. Regresyon modelinin performansı, Tablo 4.11'de verilen ANOVA sonuçları kullanılarak değerlendirilmiştir.

**Tablo 4.11 : Partikül boyutu için ANOVA sonuçları.**

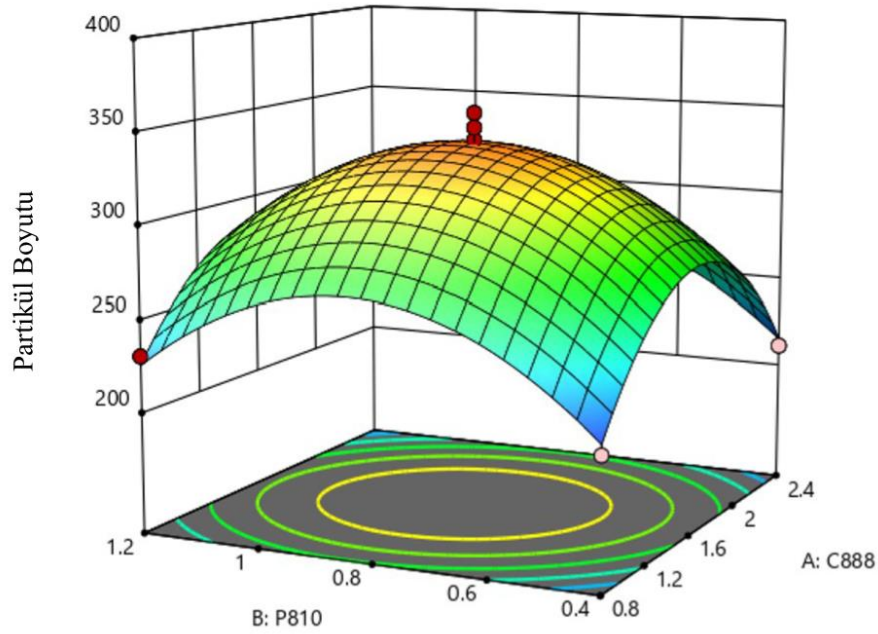
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Model	44,776.53	5	8955.31	65.73	< 0.0001	significant
A-C888	4.29	1	4.29	0.0315	0.0642	
B-P810	163.55	1	163.55	1.20	0.0095	
AB	40.96	1	40.96	0.3006	0.0005	
A <sup>2</sup>	29,826.99	1	29,826.99	218.92	< 0.0001	
B <sup>2</sup>	20,420.68	1	20,420.68	149.88	< 0.0001	
Residual	963.72	7	136.25			not significant
Lack of Fit	223.70	3	74.57	0.4086	0.7560	
Pure Error	730.01	4	182.50			
Cor Total	45,730.24	12				

Elde edilen sonuçlar, modelin istatistiksel anlamlılığına dair ikna edici veriler ortaya koymaktadır. 65,73 olan F değeri ve 0.0001'in altında oldukça düşük olan P değeri, bunun bir kanıtıdır. Özellikle 0,9791 değerindeki determinasyon katsayısı da (r<sup>2</sup>) modelin partikül boyutundaki değişkenliği açıklamak üzere yetkinliğini desteklemektedir. Bu değer, yanıtlardaki (partikül boyutu) değişkenliğin yaklaşık % 97,91'inin bu regresyon modeliyle açıklanabileceğini göstermektedir.

Buna ek olarak, sırasıyla 0,964 ve 0,94 değerindeki düzeltilmiş ve öngörülmuş r<sup>2</sup> değerleri ve her iki değer 0,2'den daha az bir farkla birbirine yakın olması da modelin kodlanan parametreler ile partikül boyutu arasındaki ilişkiyi tanımlamadaki uyumluluğunu vurgulamaktadır. Bu bulgular, regresyon modelinin A ve B kodlu parametrelere dayalı olarak partikül boyutunu tahmin etme kabiliyetini doğrulamaktadır.

Tablo 4.11'de sunulan ANOVA sonuçları, formülasyon bileşenlerindeki miktar değişimlerinin KLN boyutu üzerine etkisi hakkında bilgi vermektedir. Bilhassa, P810 miktarındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bir etki gösterirken ( $p < 0.05$ ), C888 miktarındaki değişiklikler boyut üzerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık göstermemiştir ( $p > 0.05$ ). Bu durum, partikül boyutunun belirlenmesinde P810 miktarının C888'e kıyasla daha aktif rol oynadığını göstermektedir.

Bağımsız değişkenlerin sonuçlar üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi adına Şekil 4.4'te verilen 3B yanıt yüzey grafikleri kullanılmıştır. Yüzey aktif madde seviyelerinin partikül boyutu üzerindeki etkisi, Şekil 4.4'te bulunan 3B yanıt yüzeyi grafiği ile aydınlatılmıştır.



**Şekil 4.4 :** KLN'nin partikül boyutu değerlerine ait üç boyutlu yanıt yüzey grafiği.

Yüzey aktif madde miktarı belirli bir aralıkta arttıkça partikül boyutunun da buna bağlı olarak artış sergilediği gözlemlenmiştir. Özellikle yüzey aktif madde miktarı % 0,4'ten % 0,8'e yükseltildiğinde, partikül boyutunda artış tespit edilmiştir. Bununla birlikte, bu aralığın ötesinde daha yüksek miktarda yüzey aktif madde varlığının partikül boyutunda azalmaya yol açtığı görülmüştür. Bu ilgi çekici olgudan, potansiyel bir yüzey aktif madde doygunluk noktası veya KLN oluşum sürecinin mikro ortamındaki değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

Deneysel veriler ve grafiksel gösterim, KLN formülasyonu bağlamında yüzey aktif madde konsantrasyonu ve partikül boyutu arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Partikül boyutunda belirli bir eşiğe kadar gözlenen artış ve ardından gelen azalma, istenen partikül özelliklerinin elde edilmesinde yüzey aktif madde miktarının hassas bir şekilde kontrolünün önemini vurgulamaktadır.

Formülasyon dahilindeki lipitlerin, yüzey aktif maddelerin ve bunların oranlarının doğru bir şekilde seçimi; partikül boyutunu, depolama sırasında uzun vadeli stabiliteyi, ilaç yüklemesini ve salım davranışını etkilemektedir. Dolayısıyla, formülasyon bileşenlerinin ve oranlarının taşıyıcının özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması her ilaç için optimum bir KLN formülasyonunun elde edilebileceği anlamını taşımaktadır [120].

Ortamdaki yüzey aktif madde miktarının yetersiz olması, lipit partiküllerin yüzeylerinin açıkta kalması ve dolayısıyla sterik veya elektrostatik itme kuvvetlerinin yokluğuna neden olarak lipit partiküllerin birbirine yaklaşması ve kümelenmesiyle sonuçlanmaktadır [265].

Öte yandan yüzey aktif maddeler; düşük konsantrasyonda doğrudan partikül yüzeyine adsorbe olmakta, yüksek konsantrasyonda ise partikül yüzeyinde döngü ve kuyruk oluşturarak nanopartiküller arasında köprülerin meydana gelmesiyle agregasyona yol açmaktadır [270]. Bu da çalışmamız ile karşılaştığımız yüzey aktif madde konsantrasyonunun artmasının partikül boyutunu arttırdığı bulgusunu doğrulamaktadır.

Çalışmamızdaki bulgunun aksine yapılan bir başka çalışmada; yüzey aktif madde konsantrasyonunun artması ile KLN'nin ortalama partikül boyutu değeri azalmıştır. Bunun nedeni, yüzey aktif madde konsantrasyonunun artmasıyla yüzey geriliminin azalmasının homojenizasyon işlemi esnasında partiküllerin ayrışmasını kolaylaştırması ve partikül boyutunun küçülmesi olarak ifade edilmiştir [271].

Durán-Lobato ve ark. hazırladıkları KLN için yüzey aktif madde konsantrasyonundaki artışın partikül boyutunda azalmaya yol açtığını, yüzey aktif madde ve lipit konsantrasyonlarının eşit oranda artırılmasının ise partikül boyutunda önemli değişikliklere neden olmadığını saptamıştır [273].

Yüzey aktif madde miktarının fazla olması, lipit matriksin fizikokimyasal özelliklerini değiştirebilmekte veya arttırılmış sterik stabilizasyon yoluyla daha küçük nanopartiküllerin oluşumunu teşvik edebilmektedir [274].

İyonik yapılı yüzey aktif maddeler nanopartiküllerin yüzey yükünü arttırarak elektrostatik itmeye neden olmak suretiyle fiziksel stabiliteyi arttırırken, iyonik-olmayan yüzey aktif maddeler sterik stabilizasyon etkisi sayesinde nanopartikül agregasyonunu önlemekte, formülasyona yüksek hareket kabiliyetine sahip yardımcı yüzey aktif maddelerin eklenmesi ise kolloidal dispersiyonların agregasyonunu geciktirmektedir [133].

Çalışmamızda, katı lipit miktarındaki değişim partikül boyutu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe ve etkiye neden olmamıştır. Fakat yapılan başka bir çalışmada; katı lipit (Precirol ATO 5) miktarının partikül boyutunu etkilediği ve lipit miktarının yükselmesi ile partikül boyutunda anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Artan lipit konsantrasyonu ile sistemin viskozitesinin artması ve partikül yüzeyini kaplayacak yeterli yüzey aktif maddenin bulunmaması partikül boyutundaki büyümenin muhtemel sebepleri olarak ifade edilmiştir [233].

#### 4.3.2 Katı lipit nanopartikülün optimizasyonu çalışması

Optimum KLN formülasyonu, Design-Expert yazılımı kullanılarak CCD matrisinden elde edilen veriler neticesinde seçilmiştir. Amaçlanan limitler ise, Kurkumin için en yüksek EE değeri ve partikül boyutu değerinin en aza indirilmesi olarak belirlenmiştir. İstatistiksel hesaplamalar yoluyla optimum formülasyon için C888 ve P810 olarak seçilen kritik parametreler sırasıyla % 2,22 ve % 0,83 olarak bulunmuştur.

Ardından bu parametreler, optimize edilmiş KLN formülasyonunun üç tekrarlı olarak hazırlanmasında kullanılmış ve ideal koşullar altında modelin tahmin hassasiyetinin doğrulanması amaçlanmıştır.

Deneysel bulgular öngörülen sonuçlarla karşılaştırıldığında ise, Tablo 4.12'de ayrıntılı olarak açıklandığı üzere deneysel verilerin modelin öngörülerıyla yakından uyduğu görülmüştür. Tahmin edilen ve elde edilen sonuçlar arasındaki bu uyum, modelin güvenilirliğini ve önemini vurgulamaktadır.

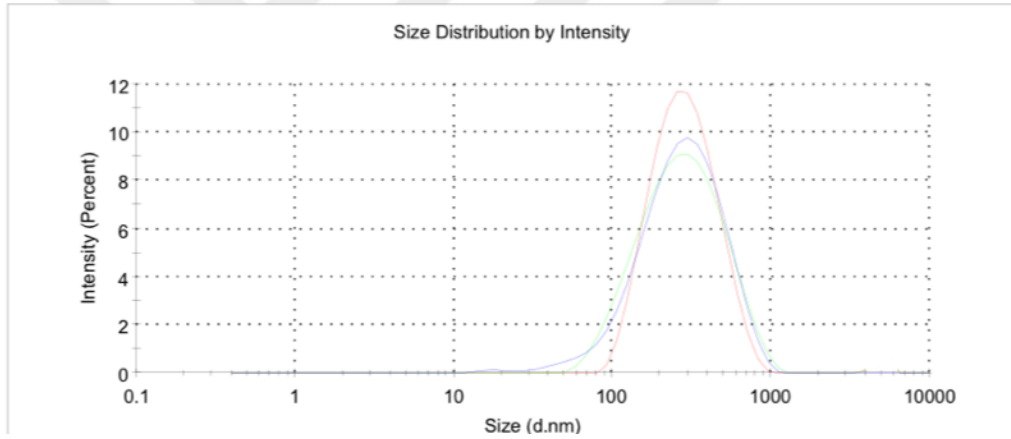
**Tablo 4.12 :** Optimizasyonu yapılmış KLN'nin öngörülen ve deneysel yanıtları.

Yanıtlar	Öngörülen değer	Deneysel değer	Öngörü hatası (%)
Enkapsülasyon etkinliği (%)	78.21	77.21±4.28	1,01
Partikül boyutu (nm)	297.37	292.11±9.43	1,77

Formülasyonun optimizasyonu için kullanılan stratejinin; optimum KLN formülasyonunun belirlenmesini etkin bir şekilde kolaylaştırdığı, partikül boyutu ve Kurkumin için EE değerleri bakımından istenen kriterlerin karşılanmasını sağladığı görülmektedir.

Deneysel tasarımlar, farklı değişkenlerin göreceli anlamlılığına dair tahminler sağlayan formülasyon süreçlerini optimize etmek üzere faydalı araçlardır. YYM, çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerde optimum formülasyonun oluşturulması üzere işlem değişkenlerinin eşzamanlı olarak analiz edilmesinde yüksek oranda güvenilirlik sağlamaktadır [227].

Zetasizer Nano ZSP cihazı ile gerçekleştirilen partikül boyutu ölçüm değerlerinin sonuçlarına dair grafik Şekil 4.5'te yer almaktadır. Optimum formülasyona ait nanopartiküller için partikül boyutu değeri  $292,11 \pm 9,43$  nm olarak elde edilmiştir.



**Şekil 4.5 :** Optimum KLN formülasyonun partikül boyutu verileri.

Partikül boyutu; lipitlerin kimyasal yapısı, kullanılan yüzey aktif maddeler ve kimyasal etkileşimler gibi çeşitli faktörlerle yakından ilişkilidir. Örneğin yüzey aktif maddeler, homojenizasyon boşluğundan ayrıldıklarında oluşan damlaları koalesans oluşumunun önlenmesi için hızlı bir şekilde stabilize edebilmelidir. Polihidroksi yüzey aktif maddeler bunu başarabilmektedir [274]. İlave olarak, yüksek devirli homojenizasyon yöntemi ile ortalama partikül boyutu etkin bir şekilde azalmakta ve artan homojenizasyon döngüsü sayısı ile dispersiyonların partikül boyutunda küçülme gözlenmektedir [255].

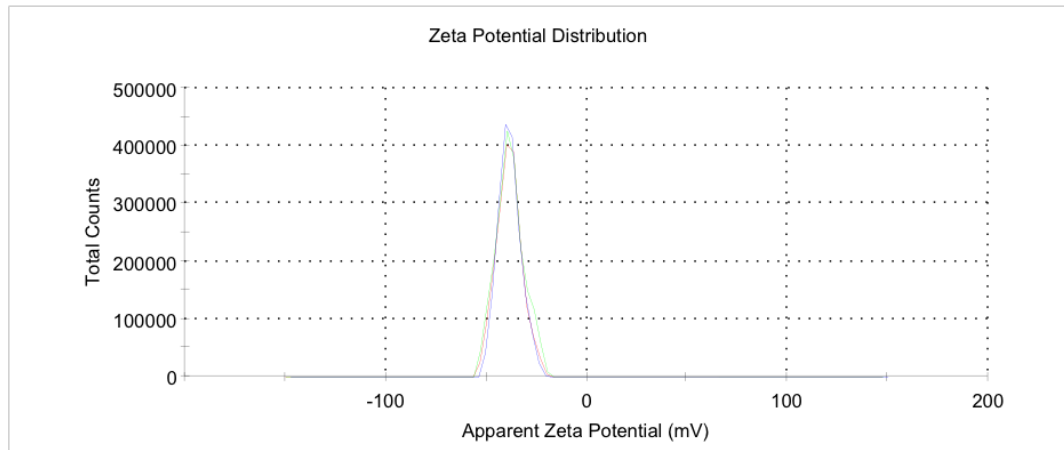
Gerçekleştirilen bir çalışmada, geliştirilen Kurkumin yüklü KLN'nin ortalama partikül boyutu 134,6 nm olarak bulunmuştur [275]. Bir başka çalışmada, polietilen glikol

(PEG) zinciri takılı Kurkumin yüklü KLN (CUR-pKLN) elde edilmiştir. Formülasyon; ortalama partikül boyutu, zeta potansiyeli, boyut dağılımı değerleri ve morfoloji açısından karakterize edilmiştir. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleriyle doğrulanan 200 nm'nin altındaki ortalama partikül boyutu değeri ile CUR-pKLN'lerin uzun vadede başarılı bir stabilite göstereceği öngörülmüştür [276].

Tiyaboonchai ve ark. hazırladıkları kurkuminoid yüklü KLN'nin lipit konsantrasyonunu % 5'ten % 12,5'e (a/a) çıkardıklarında ortalama partikül boyutunun 447'den 1198 nm'ye yükseldiğini tespit etmişlerdir [270]. Bu bulgu, çoğu vakada lipit miktarının % 5-10 (a/a) üzerine çıkarılmasının daha büyük partikül boyutları ile sonuçlandığını bildiren literatür verileri ile de uyumludur [132].

Yapılan bir çalışmada, kurkuminoid (Kurkumin, Desmetoksikurkumin ve Bismetoksikurkumin) yüklü KLN optimize edilerek ortalama partikül boyutu değeri  $160,7 \pm 2,69$  olarak saptanmıştır [264].

Formülasyonların zeta potansiyeli, Yöntem 3.2.2.2'de bahsedildiği üzere Zetasizer Nano ZSP cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen zeta potansiyeli ölçüm sonuçlarına dair grafik Şekil 4.6'da yer almaktadır. Bu çalışmada optimum KLN formülasyonu  $-37,8 \pm 1,4$  mV'luk bir zeta potansiyeli sergilemek suretiyle negatif yüklü yüzeye işaret etmiştir.



**Şekil 4.6 :** Optimum KLN formülasyonun zeta potansiyeli verileri.

Stabilizatör mahiyetinde kullanılan ve iyonik-olmayan polihidroksi yüzey aktif madde olarak P810'un yapısı gereği daha düşük bir zeta potansiyeli sergilemesi beklenebilmektedir. Bu düşünce, iyonik-olmayan yüzey aktif maddelerce oluşturulan doğal sterik stabilizasyondan kaynaklanmaktadır. Ancak, ölçümlerimiz nispeten daha

yüksek bir zeta potansiyeli ortaya koymuştur. Bu da yüzeyde adsorbe edilmiş iyon veya yüzey aktif madde kaynaklı ek yüklerin varlığına işaret etmektedir.

P810'un yapısı bu gözleme ışık tutmaktadır. Yüzeye dahil edilmiş bir hidrofobik çapa ile sulu faza uzanan glikoz moleküllerinden oluşan genişletilmiş bir hidrofilik kuyruktan meydana gelmektedir. Bu konfigürasyon, P810'un su molekülleriyle etkileşime girmesini mümkün kılmakta ve negatif yüklü hidroksil iyonlarını güçlü bir şekilde çekmektedir. Bu etkileşimlerin gözlemlenen zeta potansiyeline katkıda bulunduğu düşünülmekte ve bu da yüzey yükleri ve moleküler yapının karmaşık etkileşimine işaret etmektedir [255, 274].

Kolloidal dispersiyonların yüzey yükünü gösteren bir parametre olarak zeta potansiyeli, bu sistemler içindeki moleküllerin ve nanopartiküllerin davranışını anlamak açısından önemli bir göstergedir. Kolloidal dispersiyonların stabilitesinin değerlendirilmesi ve kolloidal partiküller arasındaki etkileşimlere dair görüş sağlamaktadır. Zeta potansiyeli, elektrostatik etkileşimi incelemek için kullanılmakta ve zaman içerisinde partiküllerin değişimini tetikleyerek moleküler agregasyon, koagülasyon ve flokülasyon oluşumuna sebebiyet verebilmektedir [277].

Bir formülasyonun mükemmel bir fiziksel stabiliteye sahip olması için - 60.0 mV üzerinde, iyi bir fiziksel stabiliteye sahip olması için ise - 30.0mV üzerinde bir zeta potansiyeline sahip olması gerekmektedir [274]. - 5 mV ile + 5 mV arasındaki değerler de agregasyonun hızlı bir şekilde gerçekleşeceğine işaret etmektedir [255].

Zeta potansiyelinin yüksek olması nanopartiküllere yüksek bir enerji bariyeri sağlayarak depolama stabilitesinin artmasına katkıda bulunurken, düşük zeta potansiyeli enkapsüle edilmiş ilaçların kolayca salımına neden olmaktadır. Bu nedenle orta düzeyde bir zeta potansiyeli, depolama stabilitesi ve ilaç salımı arasındaki dengenin korunması açısından önemlidir [278].

Daha uzun karbon zinciri barındıran lipitlerin diğer lipitlere kıyasla küçük ve homojen partiküller üretme eğiliminde olduğu ve bu partiküllerin de daha yüksek zeta potansiyeli göstermelerinden ötürü daha kararlı oldukları görülmüştür. Bu durum, yapısındaki doymuş yağ asitleri sebebiyle uzun karbon zincirine sahip lipitlerin doğası gereği daha büyük bir negatif yüke sahip olduğunu göstermektedir. Yüzeylerindeki negatif yük fazlalığı, partiküller arasında daha fazla itmeye sebep olmaktadır.

Dolayısıyla bu partiküllerin kümeleşme eğilimi, düşük negatif yüke sahip partiküllere kıyasla daha az olmaktadır [278].

Öte yandan KLN'ler için negatif zeta potansiyeli değeri, lipit matris yüzeyindeki C888 kaynaklı behenik asit varlığıyla ilişkilendirilmektedir [253].

Kovacevic ve ark. P810 ile stabil hale getirilmiş nanopartiküllerin matrisindeki yağ miktarı arttıkça zeta potansiyelinde değişim olmadığını ve 90 günlük depolama süresince zeta potansiyelinde değişim gözlemlenmemesinin nedeninin P810'un sağladığı etkin fiziksel stabilite olduğunu vurgulamıştır [274]. Geliştirilen tüm lipit nanopartikül türleri için P810'un son derece etkin bir stabilizör olduğu vurgulanmıştır [279].

Katı lipit C888 ile yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanarak Kurkumin yüklü KLN'nin geliştirildiği bir çalışmada formülasyonun zeta potansiyeli  $-9.67 \pm 1.47$  olarak tespit edilmiştir [280].

Prabhu ve ark. değişen konsantrasyonlarda katı lipit (gliserol monostearat) ve yüzey aktif madde (Tween 80) içeren Kurkumin yüklü KLN formülasyonları geliştirmiş ve zeta potansiyeli değerlerini  $-10.17 \pm 0.33$  ile  $-18.56 \pm 0.55$  aralığında ölçmüştür [259].

Gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, Kurkumin yüklü PEGlenmiş KLN (CUR-pKLN) elde edilmiştir. Formülasyon; ortalama partikül boyutu, zeta potansiyeli, partikül boyutu dağılımı ve morfolojisi açısından karakterize edilmiştir. Son olarak, elde edilen formülasyonun uzun süreli stabilitesi analiz edilmiştir. Hazırlanan formülasyon için zeta potansiyeli değeri  $-30$  mV civarında ölçülmüş ve bu nedenle uzun vadede CUR-pKLN'nin verimli bir stabilite göstereceği öngörülmüştür [276].

Dolatabadi ve ark. kurkuminoid (Kurkumin, Desmetoksikurkumin ve Bismetoksikurkumin) yüklü KLN çalışmıştır. Optimize edilmiş Kur-KLN formülasyonunun zeta potansiyeli değeri  $-14.7 \pm 2.61$  olarak saptanmıştır [264].

Yapılan bir çalışmada; iyonik-olmayan yüzey aktif madde Poloxamer 188'in partikül yüzeyini kaplamak suretiyle nanopartikülleri sterik olarak kararlı kıldığı ve artan yüzey aktif madde konsantrasyonunun nanopartiküller arasındaki elektrostatik itmeyi azalttığı ifade edilmiştir [252].

Yüzey aktif bölümü kısmi gliserit (P810 gibi monogliserit, digliserit ve bunların karışımı) olan yüzey aktif maddeler, lipit nanopartiküllerin etrafında daha katı halde

yüzeysel aktif filmler oluşturarak uzun vadeli fiziksel stabiliteyi iyileştirmektedir. Partikül boyutu; lipitlerin kimyasal yapısı, kullanılan yüzeysel aktif maddeler ve kimyasal etkileşimler gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Yüzeysel aktif maddeler, homojenizasyon boşluğundan ayrıldıklarında oluşan damlaları koalesans oluşumunu önlemek için hızlı bir şekilde stabilize edebilmelidir. Ve polihidroksi yüzeysel aktif maddeler bunu başarabilmektedir [274].

Formülasyonların partikül boyutu dağılımı, Yöntem 3.2.2.2'de bahsedildiği üzere Zetasizer Nano ZSP cihazı kullanılarak elde edilen PDI değerlerinin değerlendirilmesi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda, optimum KLN formülasyonları genellikle 0,3 eşik değerinin altında PDI değerleri sergilemiştir. Bu değer, amaçlanan doğrultuda KLN'ye ait boyut dağılımının dar olduğunu ve partiküller arasında sınırlı değişkenlik olduğunu göstermektedir. Böylesine kontrollü bir boyut dağılımı, KLN'nin formülasyon içerisinde homojen şekilde dağılması ve agregasyon veya çökmeye karşı koyabilmesi için gerekmektedir.

Bir nanopartikül formülasyonunun stabilitesini muhafaza edebilmesi için PDI değerinin kabul edilebilir bir aralıkta bulunması gerekmektedir. Yüksek değerler geniş bir partikül boyutu aralığına ve daha büyük bir değişebilirliğe işaret etmekte, bu da zaman içinde agregasyon veya sedimentasyon gibi sorunlara yol açabilmektedir. Bunun aksine, PDI değerlerinin düşük olması daha homojen ve dar bir boyut dağılımına işaret ederek uzun vadede formülasyonun stabil kalması ve istikrarlı bir performans sağlaması için hedeflenmektedir.

Yapılan bir çalışmada, kurkuminoid yüklü KLN geliştirmiş ve lipit konsantrasyonu % 5'ten % 12,5'e (a/a) çıkarıldığında PDI değerlerinin 0,4'ten 0,7'ye yükseldiği tespit edilmiştir [270]. Bu bulgu, çoğu vakada lipit miktarının % 5-10 (a/a) üzerine çıkarılmasının daha büyük partikül boyutları ve daha geniş boyut dağılımları ile sonuçlandığını bildiren diğer literatür verileri ile uyumluluk göstermektedir [132].

KLN formülasyonlarının EE değeri, yöntem 3.2.2.3'te belirtildiği üzere başlangıçtaki lipit dispersiyonu içerisindeki toplam etken madde miktarından enkapsüle olmayan etken madde miktarının çıkarılması ile elde edilen değer toplam etken madde miktarına bölünerek 100 ile çarpılması sonucunda belirlenmiştir. Optimum KLN

formülasyonu için, Kurkumin ve Turmeron'un EE değerini analiz etmek üzere santrifüj yöntemi kullanılmıştır.

Formülasyon için Kurkumin'e ait EE değeri %  $77,21 \pm 4,28$  olarak bulunmuştur. Formülasyon için Turmeron'un EE değeri ise %  $75,12 \pm 2,51$  olarak bulunmuştur. Bu değer, Turmeron'un KLN matrisine yüksek bir oran ile enkapsüle olma başarısını doğrulamıştır. Turmeron'un fizikokimyasal özellikleri, EE değerinin belirlenmesinde aktif bir rol oynamaktadır. Lipofilik bir bileşik olan Turmeron'un KLN'nin lipit matrisine daha yüksek bir miktarda sahip olması beklenmektedir, bu da EE'yi olumlu yönde etkilemektedir.

Righeschi ve ark. ise, katı lipit olarak C888 kullandıkları Kurkumin yüklü KLN için yaklaşık % 70 değerinde yüksek bir EE elde etmiştir [253]. Bu değer, çalışmamız ile elde edilen %  $77,21 \pm 4,28$ 'lik EE değerinin altında kalmaktadır. C888 ile geliştirilen Kurkumin yüklü bir başka KLN için EE değeri %  $81,92 \pm 2,91$  olarak hesaplanmıştır [275].

Gerçekleştirilen bir çalışmada, Kurkumin yüklü PEGlenmiş KLN (CUR-pKLN) elde edilmiştir. Formülasyon; ortalama partikül boyutu, zeta potansiyeli, boyut dağılımı ve morfolojisi açısından karakterize edilmiştir. Hazırlanan CUR-pKLN'lerin EE değeri yaklaşık % 82 olarak bulunmuştur [276].

Dolatabadi ve ark. kurkuminoid (Kurkumin, Desmetoksikurkumin ve Bismetoksikurkumin) yüklü KLN çalışmıştır. Optimize edilmiş formülasyon için EE değeri %  $95,30 \pm 1,71$  olarak saptanmıştır. EE değerinin yüksek olması, Kurkuminoidlerin lipit fazı Precirol® ATO5 içerisindeki yüksek miktardaki çözünürlüğüne atfedilmiştir. Ayrıca, yapısında farklı yağ asidi zincirleri barındırması nedeniyle Precirol® ATO5'in oluşturduğu kusurlu kristal yapının ilacın yüklenmesi için alan sağladığı ifade edilmiştir [264].

Prabhu ve ark. katı lipit (gliserol monostearat) ve yüzey aktif madde (Tween 80) miktarlarını değiştirerek geliştirdikleri 6 farklı Kurkumin yüklü KLN'nin EE değerlerini %  $68,46 \pm 3,2$  ve  $81,68 \pm 2,08$  aralığında gözlemlemiştir. Yüzey aktif madde ve katı lipid konsantrasyonlarının artmasının EE değerinin de artmasına yol açtığı ifade edilmiştir [259].

Gerçekleştirilen bir başka çalışmada, Kurkumin yüklü KLN geliştirilmiş ve toplam ilaç içeriği % 92,3371 olarak bulunmuştur [275].

Vandita ve ark. tarafından üretilen Kurkumin yüklü KLN ile %  $81.92 \pm 2.91$  değerinde yüksek EE'ye ulaşılmıştır [281].

Öte yandan KLN'ler için uygun olduğu düşünülen düşük erime noktalı lipitlerin, trigliseritlerin, kısmi gliseritlerin ve amfifilik lipitlerin daha fazla ilaç yüklenebilmesini, deri penetrasyonunun iyileştirilmesini ve topikal olarak uygulandığında ilaç sızıntısının azaltılmasını sağlamak gibi üstünlükleri de bulunmaktadır [282].

#### **4.3.3 Katı lipit nanopartikül formülasyonlarındaki etken madde miktar tayini**

Etken madde miktar tayini, 3.2.2.4'te detaylıca belirtildiği üzere çalışılmıştır. Bu tayin, optimizasyonu yapılmış KLN formülasyonunun hazırlanması esnasında herhangi bir etken madde kaybı olup olmadığına işaret etmektedir. Gerçekleştirilen deneyler, Kurkumin ve Turmeron için sırasıyla %  $97,21 \pm 0,72$  ve %  $95,45 \pm 1,21$  olmak üzere KLN dispersiyonundan belirgin olarak yüksek geri kazanım oranlarının olduğunu göstermiştir.

Bu yüksek geri kazanım oranı; formülasyonu hazırlama yönteminin etkin ve başarılı olduğuna, özellikle Kurkumin ve Turmeron biyoaktifleri için yöntemin uygunluğuna dikkat çekmiştir. Yine yüksek seviyedeki yükleme kapasitesi göstermiştir ki KLN dispersiyonunun hazırlanma süreci Kurkumin ve Turmeron için belirgin bir bozunma ya da kayba sebebiyet vermemektedir. Elde edilen etken madde miktarı yüzdeleri, taşıyıcı sistem olarak KLN'nin kullanıldığı literatürlerde erişilen yüksek etken madde miktarı verileri ile uyumluluk göstermektedir [140, 283].

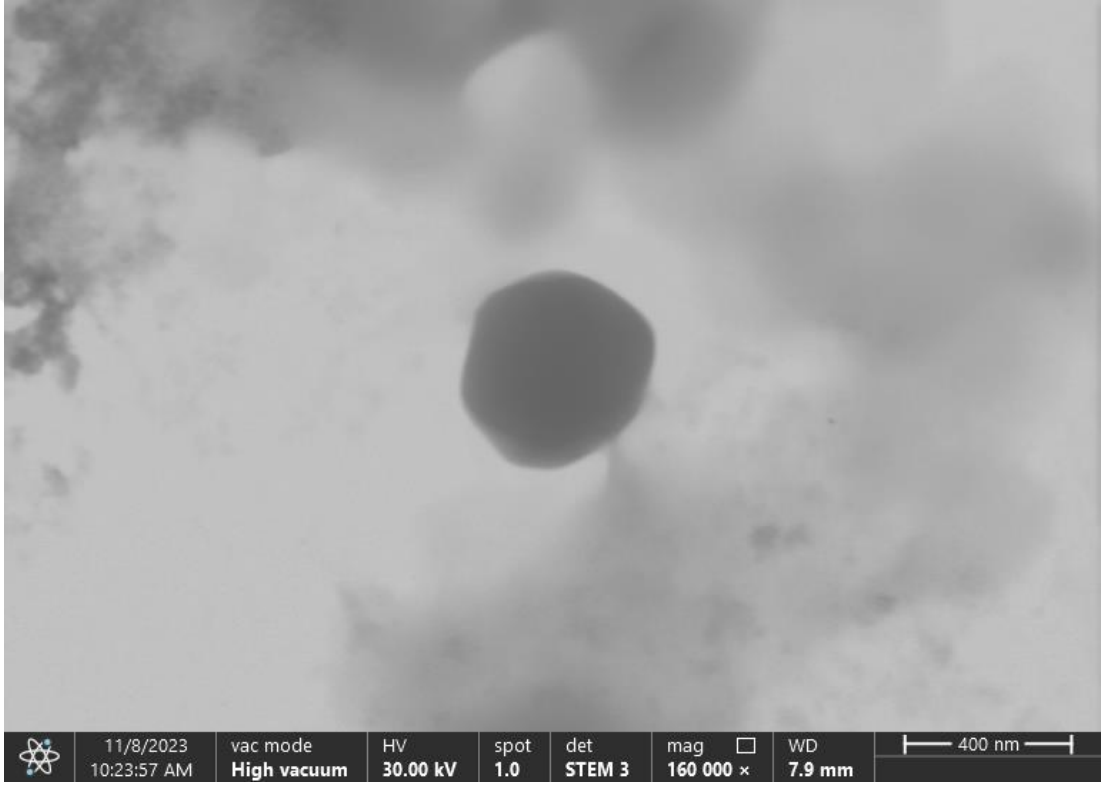
Sandhu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, katı lipit Compritol® 888 ATO ile yüksek devirli homojenizasyon yöntemi kullanılarak Kurkumin yüklü KLN geliştirilmiştir. Etken madde miktar tayini çalışmasında Kurkumin içeriği  $5.8 \pm 0.2$  mg/mL ile % 96 olarak tespit edilmiştir [280].

Gerçekleştirilen bir çalışmada, Kurkumin yüklü KLN geliştirilmiş ve toplam ilaç içeriği % 92,3371 olarak bulunmuştur [275].

Vandita ve ark. tarafından üretilen Kurkumin yüklü KLN için %  $81.92 \pm 2.91$  değerinde yüksek EE değeri bulunmuştur [281].

#### 4.4 Katı Lipit Nanopartiküllerin Morfolojik Analizi

KLN'nin karakteristiğini teşhis etmek bakımından formülasyonun morfolojisi detaylıca incelenmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.7'de görülmektedir. ESEM görüntüleri ile küresel ve pürüzsüz bir yüzey ile karakterize edilen ayırt edici bir morfoloji saptanmıştır.



Şekil 4.7 : Optimize edilmiş KLN'ye ait ESEM görüntüsü.

ESEM cihazı ile yapılan çalışmalar, partiküllerin morfolojik yapılarına dair bilgi sağlarken aynı zamanda Zetasizer Nano ZSP cihazı ile elde edilen partikül boyutu verilerini de doğrulamıştır. Veriler arasındaki uyumluluk, ölçüm tekniklerinin hassasiyetini ve doğruluğunu geçerli kılmakla kalmayarak KLN'nin fiziksel karakteristiğini etraflıca anlamayı mümkün kılmıştır. Her iki metot ile elde edilen sonuçların tutarlı bir korelasyon sunmuş olması, rapor edilen partikül boyutu değerlerinin güvenilirliğini ve doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Gerçekleştirilen bir çalışmada, Kurkumin yüklü KLN'ler hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. TEM görüntüleri ile boş ve ilaç yüklü KLN'lerin neredeyse küresel bir şekilde olduğu doğrulanmıştır [271].

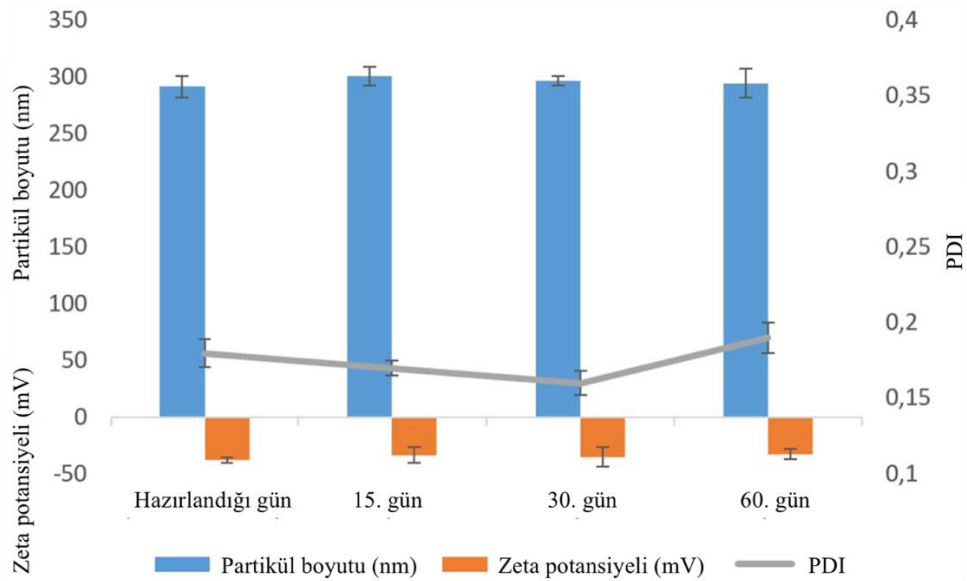
Bir diğerk çalışmada, Kurkumin yüklü KLN geliştirilmiş ve TEM ile yapılan morfolojik analizlerde berrak ve pürüzsüz bir yüzey ile küresel şekle sahip nanopartiküller saptanmıştır [252].

Sandhu ve ark. yüksek devirli homojenizasyon yöntemini kullanarak katı lipit C888 ile geliştirdikleri Kurkumin yüklü KLN'nin morfolojik analizlerinde, FESEM ve TEM kullanarak küresel şekilde küçük partiküller tespit etmiştir. Ayrıca, KLN'nin dışında homojen bir şekilde partikülün tüm yüzeyini kaplayan yüzey aktif madde tabakasının da açıkça görüldüğü ifade edilmiştir [280].

#### 4.5 Katı Lipit Nanopartiküllerin Stabilitte Çalışması

Optimum KLN formülasyonunun stabilite çalışması, Yöntem 3.2.3'de belirtildiği üzere buzdolabında  $5 \pm 3$  °C'de 60 günlük süre boyunca kontrollü bir şekilde yürütülmüştür. İncelenen parametreler; partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI değerleri ile formülasyonun fiziksel karakteristiği olarak seçilmiştir.

Şekil 4.8'de gösterildiği üzere çeşitli zaman aralıklarında elde edilen veriler incelenmiştir. 60 gün süresince  $5 \pm 3$ °C koşulunda partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI değerleri incelenmiş ve değerlerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. ( $p>0.05$ ) Bu tutarlı profil, formülasyonun belirtilen saklama koşulları altında stabilitesini koruyabildiği düşüncesini kuvvetlendirmektedir.



Şekil 4.8 : Optimum KLN'nin stabilite çalışmalarının sonucu.

Optimum KLN formülasyonunun zeta potansiyeli  $-37,8 \pm 1,4$  mV olarak ölçülmüştür. KLN'nin stabilitesi göz önünde bulundurulduğunda, 60 gün süresince zeta potansiyelinin  $-30$  mV değerinin üzerinde kalmış olması olumlu bir göstergedir. Yüksek değerlikli negatif zeta potansiyelinin uzun zaman süresince korunmuş olması; elektrostatik kuvvetlerin partikül agregasyonuna yol açabilecek potansiyel kuvvetleri başarılı bir şekilde etkisiz hale getirdiği anlamına gelmektedir.

Elde edilen sonuçlar, yüksek değerlikli negatif zeta potansiyelinin KLN formülasyonlarının stabilitesi üzerine olumlu katkıda bulunduğu literatür verileri ile de uyumluluk göstermektedir [284, 285].

Zeta potansiyeli; partiküllerin yüzey yükünü ifade etmekte olup KLN formülasyonlarında kullanılan ve nanopartiküllerin etrafında yüklü bir tabaka oluşturan maddelerin etkinliği, agregasyonun öngörülmesi ile önlenmesi hakkında fikir vermektedir [286]. Literatürde,  $\pm 30$  mV üzerinde yüksek zeta potansiyeli değerine sahip partiküllerin aralarındaki güçlü elektrostatik itme sebebiyle agregasyona yatkınlığının daha az olduğu vurgulanmıştır [287]. Bu itme kuvveti, parçacıkları birbirine yaklaştırma eğiliminde olan van der Waals kuvvetlerine karşı koymaktadır.

KLN'lerin geliştirilmesinde yüzey aktif madde veya yüzey aktif madde karışımlarının ve konsantrasyonlarının doğru bir şekilde seçilmesi, partiküllerin yüzey özelliklerini etkilemesi bakımından önemlidir. En iyi seçimin, partikül agregasyonunu etkin bir şekilde önleyerek stabilitenin iyileştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir [288].

Optimize edilmiş bileşenlere sahip KLN dispersiyonlarının üç veya daha fazla yıl süresince fiziksel stabiliteyi koruduğu bildirilmesine karşın bazı formülasyonların belirli depolama süresinden sonra jel oluşturma eğiliminde olduğu görülmüştür. Bu sorun, stabilizasyonu sağlayan yüzey aktif madde karışımının içeriği ve konsantrasyonu değiştirilerek bertaraf edilmiştir [144].

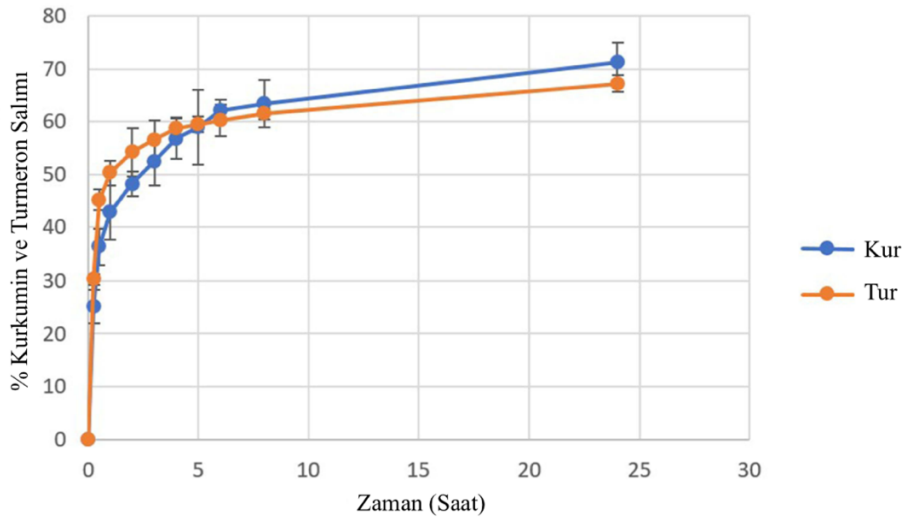
KLN'lerin sulu dispersiyonları kullanım kolaylığı ve maliyet açısından tercih edilmekte fakat depolama sırasında flokülasyon gözlemlenebilmekte, bu sorun ise formülasyona yardımcı yüzey etken madde eklenerek önlenmektedir [150]. Öte yandan, partiküllerin dış kabuğunda kümelenen ilaçların kimyasal stabilitesi için yüzey aktif madde karışımının da önemli bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur [144].

KLN formülasyonları, etken maddelerin stabilitesinin korunmasına katkı sağlamaktadır. Katı matris, kararsız etken maddeleri hidroliz ve oksidasyon gibi reaksiyonlardan koruyabilmektedir. Sulu dispersiyonlarına kıyasla KLN'lerin; tokoferol, retinol ve koenzim Q10'un kimyasal kararlılığını arttırarak etken maddelerin stabilitesini iyileştirdiği belirtilmiştir [34].

Yapılan bir çalışmada, hazırlanan Kurkumin yüklü KLN'ler için  $5 \pm 3$  °C'de 12 ay süresince stabilite çalışması yürütülmüştür. Bu süre zarfında, partikül boyutu ve PDI değerlerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu sonuç, KLN'lerin üretildikleri şekilde muhafaza edilebilmelerini mümkün kılmaktadır. Sulu fazda etkin bir yüzey aktif madde konsantrasyonu içerdiği takdirde uzun süreli depolama sırasında dahi partiküllerin tek tek dağılmış halde kalmalarının sağlanabileceği belirtilmiştir [280].

#### 4.6 Katı Lipit Nanopartikül Formülasyonundan İn-Vitro Salım Çalışması

Optimizasyonu yapılmış KLN formülasyonunun ilaç salım davranışı, iyi yapılandırılmış bir yöntem olan diyaliz membran difüzyon metodu ile Yöntem 3.2.4'te açıklandığı şekilde değerlendirilmiştir. Kesin ve güvenilir sonuçların eldesi için Kurkumin ve Turmeron geçişine olanak sağlarken KLN'yi geçirmeyecek por büyüklüğüne sahip uygun bir membranın seçimi elzemdir. Şekil 4.9'da görülen *in-vitro* salım profilleri, tüm formülasyonlar için belirgin bir bifazik modelin varlığını ortaya koymuştur. Bu karakteristik salım profili, ani ilk salımı takip eden daha kademeli ve sürekli bir salımı kapsamaktadır.



Şekil 4.9 : Salım çalışması neticesinde oluşturulan % Kurkumin ve % Turmeron salım grafiği.

KLN formülasyonunun ilk 120 dakikalık ani salımı, Kurkumin ve Turmeron için sırasıyla % 48,21 ± % 2,32 ve % 54,24 ± % 4,51 olarak hesaplanmıştır. Bu durum, genellikle yüzeye ilişkili etken maddelerin hızlı salımı ile ilişkilendirilmektedir. Daha sonra, ikinci ve daha yavaş bir salım fazı ortaya çıkmıştır. Bu fazın, KLN'nin çift katmanlı yapısından devamlılık arz eden Kurkumin ve Turmeron difüzyonundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu mekanizma, bilhassa lipit çift katman içinde veya taşıyıcı sistemin dış yüzeyinde konumlanmış hidrofobik moleküller için geçerlidir. Etken madde salımının birincil mekanizmasının, lipitten meydana gelen katı matriksin aşınması yoluyla Kurkumin ve Turmeron'un difüzyonuna bağlı gerçekleşen bir salım olabileceği düşünülmüştür [289].

24 saat süresince, sırasıyla Kurkumin ve Turmeron için % 71,32 ± 3,73 ve % 67,23 ± 1,64 oranında kümülatif salım elde edilmiştir. Mevcut bulgular, topikal salım için avantaj sağlayan bifazik salıma işaret etmiştir. Bu salım profili, hedef bölgeye sürekli ilaç kaynağı sağlamakla kalmayıp uygulama sıklığını en aza indirerek hasta uyuncunu arttırmayı mümkün kılmaktadır. Ani salımı takip eden sürekli faz ise KLN'nin hem acil terapötik etkinlik hem de geniş zaman periyodu içerisinde devam eden etkinlik sağlayacağını göstermektedir.

KLN'lerin salım hızı, çok sayıda faktör tarafından belirlenmektedir. Lipit matriks, yüzey aktif madde konsantrasyonu ve sıcaklık gibi üretim koşulları değiştirilerek KLN'lerin salım profili kontrol edilebilmektedir [162]. İlave olarak, lipit konsantrasyonlarının artırılmasının sürdürülebilir bir salım sağladığı saptanmıştır. Lipit konsantrasyonunun artırılması ile nanopartikül çekirdeğine yüklenebilecek ilaç miktarı artmaktadır. Böylelikle, zenginleştirilen partikül çekirdeğindeki artan ilaç miktarı ile salım süresinin uzatılabileceği düşünülmüştür. Buna karşın lipofilik yüzey aktif maddeler, etken maddenin salımına engel teşkil edecek şekilde hareket ettiğinden ilaç salımını yavaşlatabilmektedir [278].

Salım hızını etkileyen temel iki faktör olarak KLN'nin yüzey alanının geniş ve difüzyon katsayısının yüksek olması (partikül boyutunun küçük veya matriks viskozitesinin düşük olması nedeniyle) bildirilmiştir [253]. Yüzey alanının geniş, matriks viskozitesinin düşük ve difüzyon mesafesinin küçük olması ilacın hızlı bir şekilde salınmasına neden olmaktadır [290].

KLN, lipit bir çekirdek ve amfifilik yüzey aktif maddeden oluşan bir dış kabuktan meydana gelmektedir. İlaç, dış kabuğa ve partikül yüzeyine yüklendiğinde patlama etkisi göstererek ani ve hızlı bir şekilde salınmaktadır. Öte yandan ilaç, partikül çekirdeğine dahil olduğunda daha uzun süreli bir salım gerçekleşmektedir [253]. Sırasıyla ani salım ve uzun süreli salım, ilacın lipit taşıyıcılar içindeki farklı dağılım profilleri ile açıklanmaktadır. KLN'nin yüzeysel katmanlarının veya yüzeyinin ilaç ile zenginleşmesi ani salıma neden olurken, yoğun ilaç-lipit etkileşimleri ve ilacın KLN çekirdeğine yerleşmesi ise uzun süreli salıma işaret etmektedir [28].

Prabhu ve ark. Kurkumin yüklü KLN formülasyonu geliştirerek optimize etmiştir. *In-vitro* salım çalışması, pH değeri 7.4 olan fosfat tamponu ortamında 12 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. İlaç çekirdekte bulunduğu ve lipit tabakası ile çevrelendiğinden Kurkumin'in salımı sürekli faz düzeninde gerçekleşmiştir. % 74,24 değeriyle optimize edilmiş formülasyon diğer formülasyonlara kıyasla en yüksek ilaç salım oranını göstermiştir. Daha hızlı bir Kurkumin difüzyonu sağlayan yüzey aktif maddelerin yanı sıra optimum formülasyon yüksek miktarda lipit konsantrasyonu içerdiğinden ilaç salımının daha fazla olduğu belirtilmiştir [259].

Bir çalışmada, serbest Kurkumin 4 saat içerisinde % 100 salım gösterirken hazırlanan Kurkumin yüklü NLT ile 48 saate kadar uzatılmış *in-vitro* salım gözlemlenmiştir [291].

Jourghanian ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Kurkumin yüklü KLN hazırlanmıştır. Salım çalışması, 36 ve 48 saat sonunda Kurkumin'in sırasıyla % 85 ve % 92'den fazla salındığını göstermiştir. Serbest Kurkumin dispersiyonunda ise Kurkumin'in % 95'inden fazlası bir saatten kısa bir süre içinde salınmıştır [237].

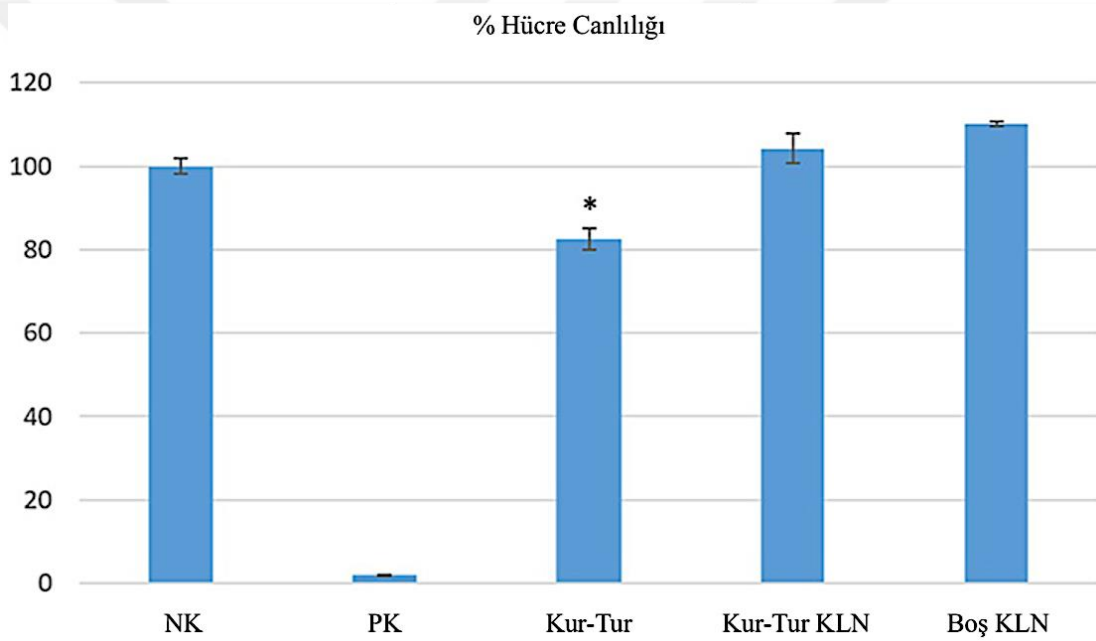
Başka bir çalışmada; Adenozin yüklü KLN hazırlanmış ve formülasyonun *in-vitro* salımı incelenmiştir. Ani olan ilk salım, lipit nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan ve hızlıca serbest kalabilen Adenozin ile ilişkilendirilmiştir. Ani salım sonrasında, KLN'lerin iç çekirdeğindeki Adenozin'in salımı gecikmeli ve yavaş bir şekilde gerçekleşmiştir. Formülasyonun lipofilik özelliğinin artması ile partikül çekirdeğine yüklenebilen Adenozin miktarı yüzeydeki ilaç miktarından fazla olmuştur. Bu da salımın yavaşlamasına yol açmıştır [278].

Patra ve ark. tarafından Kurkumin yüklü KLN'ler hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Diyaliz membran yöntemi kullanılarak *in vitro* ilaç salım çalışması

gerçekleştirilmiştir. Ani ilk salımın ardından yavaş ve devamlı bir Kurkumin salımı gözlemlenmiştir. Ani ilk salım, Kurkumin'in KLN yüzeyinden salımı ile ilişkilendirilmiştir. Bu ani salımı, lipid matriks boyunca Kurkumin'in difüzyonuna bağlı olan yavaş salım takip etmiştir [271].

#### 4.7 Üç Boyutlu Doku Modeli EpiDerm™ İle İn-Vitro Deri İrritasyon Çalışması

*İn-vitro* irritasyon çalışmaları, Yöntem 3.2.5'te belirtildiği üzere gerçekleştirilmiştir. Canlı hücreler daha güçlü absorbans ve koyu renk, canlı olmayan hücreler MTT'yi formazona çeviremediği için daha açık renk oluşturmuştur. Elde edilen bulgular, Şekil 4.10'da mevcut grafikte gösterilmiştir.



**Şekil 4.10 :** Negatif kontrol (NK, DPBS), Pozitif kontrol (PK, % 5 SDS), Kurkumin ve Turmeron, Kurkumin ve Turmeron yüklü KLN ve boş KLN için EpiDerm™ ile gerçekleştirilen in-vitro irritasyon çalışması sonuçları (\*p<0,05).

Şekil 4.10'da gösterilen bulgular, negatif kontrol grubu ve boş KLN formülasyonuna kıyasla Kurkumin ve Turmeron karışımının hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe ve dolayısıyla irritasyon etkisinde artışa sebep olduğunu ortaya koymaktadır.

Bununla birlikte, Kurkumin'in ve Turmeron'un KLN formülasyonuna enkapsüle edilmesi ile uygulama yapılan dokularda canlılık % 90'ın üzerinde kalmıştır.

Dolayısıyla KLN'nin irritasyon yapıcı etkilerine dair herhangi bir veri bulunmamıştır. Kurkumin ve Turmeron'un KLN içerisinde enkapsüle edilmesinin ve bifazik salım düzeninin, dokuların yüksek konsantrasyonda Kurkumin'e ve Turmeron'a doğrudan maruz kalmasını önlemiş olabileceği düşünülmüştür [289].

Bu sonuçlar, topikal uygulamalarda irritasyon riskini azaltmak üzere taşıyıcı sistem olarak KLN'nin etkinliğini teyit eden önemli bulgulara işaret etmektedir. Optimizasyonu yapılmış KLN'lerden Kurkumin'in ve Turmeron'un sürekli salımının; etken maddelerin deri katmanlarında uzun süre kalmasını sağlamakla birlikte Kurkumin'in ve Turmeron'un konsantrasyona bağlı sebep olabileceği irritasyon olasılığını da düşüreceği düşünülmüştür.

Deri irritasyonu, *in-vivo* olarak "bir test maddesinin uygulamasını takiben dört saate kadar deride geri dönüşümlü hasar oluşturması" olarak tanımlanmaktadır [83]. Bir kimyasalın stratum korneum ile etkileşime girerek deride geri dönüşü olmayan tam nekroza sebep olması ise geri dönüşümlü epidermal enflamatuar yanıtlardan farklıdır [46].

Formülasyonların sebep olabileceği olası irritasyonun değerlendirilmesi, hücresel bütünlüğü zedeleme ve lokal enflamatuar süreçleri başlatma kabiliyetlerini incelemek üzere önemlidir. Deri bütünlüğünün bozulması, iki temel mekanizma ile ortaya çıkmaktadır: maruziyet sonucunda maddenin fizikokimyasal özellikleri kaynaklı doğrudan etkiler (lipit tabakasının sabitleşmesi, gözenek oluşumu ve deri dokularının tahribatı gibi) ve dermal hücre membranını bozan reaktif oksijen türlerinin salınmasını içeren dolaylı etkiler [292, 293].

Çeşitli bileşenlerin irritasyona sebep olabilirliğini öngörmek üzere güvenilir protokoller oluşturma arayışında olan bilim camiası, seksen yılı aşkın bir süredir hayvan deneklerin kullanıldığı bir yöntem olan Draize deri irritasyon testine başvurmaktadır. Ne var ki, Draize testinin tavşanlar ve insanlar arasında gözlenen yanıt farklılıkları gibi kısıtlamalar göstermesi daha etik ve isabetli alternatiflerin araştırılmasına yol açmıştır [77].

Son yıllarda; Draize testi yerine *in-vitro* modeller, özellikle RhE modelleri önem kazanmıştır. Bu *in-vitro* modeller, irritasyona neden olan kimyasalların sınıflandırılması üzere daha etik ve sağlam bilimsel araçlar olarak kabul görerek irritasyon testi yönergeleri ile kılavuzlara dahil edilmiştir.

RhE, standart insan epidermisinin biyolojik özelliklerini birebir taklit edebilmektedir. RhE'ler, temsili histoloji ve hücre yapısına sahip dönüştürülmemiş insan kaynaklı keratinositlerden meydana gelmektedir. *In-vitro* deri iritasyon testleri, hücre ölüm ve enflamasyon dahil olmak üzere iritasyona karşı hücresel yanıtların değerlendirilmesinde kullanılabilir. Son yıllarda bu *in-vitro* testlerden formülasyonların deri iritasyonuna sebebiyet verme olasılığını değerlendirmek üzere aktif olarak yararlanılmaktadır [240, 241].

Yapılan literatür taramalarında, lipit nanopartiküllerin deri iritasyon potansiyellerinin analizi üzere yaygın olarak kullanılan *in-vitro* test yöntemleri olarak EpiSkin™ ve EpiDerm™'nin yer aldığı görülmüştür [294].

Topikal ilaç taşıyıcı sistemler kapsamında; özellikle Kurkumin ve Turmeron gibi biyoaktif bileşenlerin potansiyel uygulamaları irdelenirken, deri iritasyonu riskinin anlaşılması ve azaltılması son derece önemlidir. Dikkate değer biyolojik aktivitelere sahip olmakla birlikte, her etken madde gibi bu bileşiklerin de uygulama esnasında topikal iritasyon riski teşkil edebilecekleri göz önünde bulundurulmalıdır.

Yapısına dahil olacak herhangi bir bileşenin (etken madde, lipit, yüzey aktif madde) kimyasal yapısı, konsantrasyonu ve üretim koşulları KLN'nin yapısını etkilemektedir [34].

Geliştirilen bir formülasyonun deri tarafından tolere edilebilmesi, formülasyonda deri ile uyumluluk gösteren yüzey aktif maddelerin veya stabilizatörlerin varlığını gerektirmektedir. Topikal uygulamalar için formülasyon geliştirilirken deri hassasiyetine sebep olma ihtimali bakımından düşük risk taşıdığından yüksüz ve iyonik-olmayan yüzey aktif maddeler tercih edilmektedir [274]. Birden fazla yüzey aktif madde ile hazırlanan ve daha kararlı nanopartiküller içeren formülasyonların, tek bir yüzey aktif madde ile stabilize edilen formülasyonlara kıyasla toksisiteleri açısından daha az biyouyumlu olmaları beklenmektedir [294].

Maddelerin salım hızını kontrol ederek ve/veya deriyle doğrudan temasını önleyerek topikal formülasyonların iritasyon ve alerjik etki potansiyellerini azaltmak üzere bir strateji olarak çeşitli nanopartikül sistemleri önerilmiştir. Topikal olarak uygulanması amaçlanan nanotaşıyıcı sistemlere dahil edilmek üzere iritasyon potansiyeli düşük ve deri ile uyumlu iyonik-olmayan yüzey aktif maddeler seçilmelidir.

Deri bariyeri üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğundan PEG içeren yüzey aktif maddelerden kaçınılmasının gerekliliğine dair bulgular mevcuttur. Son yıllarda; PEG içeren muadillerine kıyasla daha az iritasyon ve toksisite gösteren, doğal kaynaklardan elde edilen yüzey aktif maddelere dayanan lipit nanopartiküllerin geliştirilmesi üzere odaklanılmaktadır [294].

Harde ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Adapalen içeren bir KLN formülasyonu geliştirilmiş ve formülasyonun deri iritasyon potansiyeli incelenmiştir. RhE ile yapılan deri iritasyon çalışmasının sonuçlarına göre, KLN'nin taşıyıcı sistem olarak kullanılması ilacın deri iritasyon potansiyelini önemli ölçüde düşürmüştür [289].

Bir başka çalışmada, RhE modeli SkinEthic™ RHE kullanılarak geliştirilen Kurkumin yüklü nanojel formülasyonunun deri iritasyon düzeyi incelenmiştir. Kurkumin-nanojel, boş nanojel, pozitif kontrol grubu (PBS) ve negatif kontrol grubu (uygulama yapılmamış) üzerinde histolojik gözlemler gerçekleştirilmiştir. Uygulama sonrasında dokular karşılaştırıldığında, Kurkumin yüklü ve Kurkumin içermeyen nanojel örneklerine maruz kalan modellerin benzer yapıda ve negatif kontrole karşılaştırılabilir olduğu görülmüştür. Deri eşdeğer modeli ile gerçekleştirilen histopatolojik çalışmanın sonucunda, nanojel formülasyonunun deri üzerinde koruyucu etkinlik gösterdiği görülmüştür [295].

Wosicka-Fraçkowiak ve ark. Roksitromisin yüklü KLN geliştirmiş ve deri modeli EpiDerm™ için MTT testi kullanarak formülasyonun deri iritasyon potansiyelini değerlendirmiştir. Roksitromisin yüklü ve boş KLN'ye maruziyetin ardından EpiDerm™ dokularından elde edilen hücre canlılığı sırasıyla % 92.5 ± 8.8 ve % 81.7 ± 15.3 olarak saptanmıştır. Bu verilerden yola çıkarak her iki formülasyonun da deri iritasyon potansiyeli taşımadığı sonucuna varılmıştır [296].

Tokoferol yüklü NLT, EpiDerm™ deri modeline uygulanarak deri iritasyonu açısından değerlendirilmiştir. Tokoferol yüklü NLT uygulamasının ardından hücre canlılığı % 92,7 olarak bulunmuş ve böylece hazırlanan taşıyıcı sistemin iritasyon etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. İlave olarak; epidermal dokunun dondurularak kesilmesiyle yapılan histolojik değerlendirmede tokoferol yüklü NLT'ye maruz kalan dokuların bariyer özelliklerini ve normal deriye benzeyen diğer

morfolojik özelliklerini korumuş olduğu görülmüştür. Dolayısıyla formülasyonun toksisite ve irritasyon potansiyeli taşımadığı bir kez daha doğrulanmıştır [297].

Canlı epidermisteki hedefli ilaç miktarının daha yüksek konsantrasyona ulaşması amacıyla, Prednikarbat KLN'ye yüklenmiştir. KLN'nin toksisitesini ve Prednikarbat emilimini değerlendirmek üzere RhE ve insan derisi kullanılmıştır. Bulgular incelendiğinde, deri tarafından oldukça başarılı şekilde tolere edilen bir formülasyonun geliştirildiği görülmüştür. 18 saat süren inkübasyonu takiben MTT testi gerçekleştirilerek RhE'nin (Skinethic™) hücre canlılığı % 94,5 değerinde bulunmuştur. Kreme kıyasla KLN ile Prednikarbat penetrasyonu insan derisinde % 30 oranında, RhE modeli Skinethic™'te ise 3 kat artmıştır. Bu çalışma, deriden ilaç emiliminin arttırmasında KLN'nin büyük bir potansiyel taşıdığını göstermiştir [298].

Nanotaşıyıcı sistemler, etken maddelerin hücre içerisine alımlarında dikkate değer oranda artış sağlamaktadır. Nanopartiküller, hücre yüzeyi ile etkileşime girerek hücrelerin iç ortamlarına erişebilmektedir. Bu durum, nanopartiküllere yüklenen etken maddelerin terapötik etkinlik düzeylerinde artış sağlamaktadır. Ayrıca; nanopartikülün boyutu, şekli ve kimyasal özellikleri hücresel etkileşimleri teşvik edecek şekilde düzenlenebilmektedir [299]. Katı lipid matriks ve yüzey aktif madde tabakasından meydana gelen KLN; Kurkumin gibi suda az çözünen ilaçları enkapsüle edebilmekte ve taşıdığı Kurkumin'in hücre içerisine alımını belirgin oranda arttırmaktadır [267].

Örneğin bir çalışmada; Kurkumin yüklü NLT hazırlanmıştır. *Ex-vivo* deri geçirgenlik çalışmalarında Kurkumin yüklü jele kıyasla Kurkumin-NLT yüklü jelin deri katmanlarından geçirgenliği 3.24 kat yüksek bulunmuştur. Hücre içerisine alım çalışmalarında ise Kurkumin dispersiyonuna kıyasla Kurkumin-NLT formülasyonu ile HaCaT hücrelerine Kurkumin alımının daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır [291].

A vitamini içeren emülsiyonlar, salımın çok hızlı gerçekleşmesine bağlı olarak lokal deri irritasyonuna sebep olmaktadır. A vitamini yüklü KLN ile domuz kulak derisinde irritasyon potansiyelinde düşüş, derin bir penetrasyon ve uzun süreli salım sağlanmıştır [300].

Tretinoin tedavisinin en önemli sakıncalarından biri, eritem ile karakterize olan deri irritasyonudur. Draize yama testi ile gerçekleştirilen deri irritasyon çalışmaları, Tretinoin yüklü KLN jelin ticari Tretinoin kremine kıyasla 24 saatlik uygulamadan sonra daha az irritasyona yol açtığını göstermiştir. Ticari Tretinoin kreminde 24 saat

sonunda dahi iritasyon artmaya devam ederken Tretinoin yüklü KLN jelde iritasyon artmamıştır. Sonuç olarak, Tretinoin'in deri tarafından tolere edilebilirliğini iyileştirmede piyasadaki kreme kıyasla KLN jel kayda değer bir avantaj göstermiştir. Bu durum, KLN jelin Tretinoin için hasta uyuncunu ve topikal uygulamasını geliştirme potansiyelini ortaya koymuştur. Çalışmanın ilginç bulgularından birisi, deri iritasyonundaki azalmanın deri geçirgenliğindeki düşüş kaynaklı olması beklenirken aksine etken maddenin lipit nanotaşıyıcılarla birlikte deriye nüfuzu sebebiyle iritasyonun azalmış ve deri geçirgenliğinin azalmamış olmasıdır [39].

Araştırmanın sonraki aşamasında ise, sentetik lipit yerine doğal lipitler (çekirdek yağlarının saflaştırılmış stearin fraksiyonları) kullanılmıştır. Yapılan iritasyon çalışmaları, Tretinoin-KLN jelin 24 saatlik uygulamadan sonra Tretinoin kremine kıyasla daha az iritasyona yol açtığını göstermiştir. Krem uygulamasında 24 saat sonra bile iritasyon artmaya devam ederken, Tretinoin-KLN jelde artış görülmemiştir. Bununla birlikte, krem uygulamasında 72 saat sonra eritem saptanmıştır. 5 günün sonunda ise deride soyulma ile birlikte eritem artmıştır.

Bu bulgular, önceki araştırmaya kıyasla daha çok umut vericidir. Bir önceki çalışmada, 48 saat sonra hafif iritasyon belirtileri gösteren sentetik lipit (gliseril monostearat) bazlı KLN jelleri kullanılmıştır. Mevcut araştırmada ise KLN jellerin her ikisi de 72 saate kadar iritasyon belirtisi göstermemiştir. Bu sonuç, araştırmada kullanılan lipit matriksin önemini vurgulamaktadır. Kullanılan doğal katı lipitlerin sentetik lipitlere kıyasla daha az iritasyona sebebiyet vermiş olması düşünülmektedir. İlave olarak, KLN jellerin sunduğu yüksek deri oklüzyon özelliğinin Tretinoin uygulamasında karşılaşılan kaşıntı, kuruluk ve pullanma gibi yan etkileri hafifletmeye yardımcı olması beklenmektedir [40].

Bir diğer çalışmada, Amfoterisin B yüklü topikal KLN formülasyonunun tasarımı ve geliştirilmesi üzere odaklanılmıştır. Tavşanlar üzerinde Draize yama testi ile Amfoterisin B-KLN yüklü jelin iritasyon potansiyeli değerlendirilmiştir. Sonuçlar Amfoterisin B-KLN jelin 48 saatlik uygulamadan sonra dahi önemli ölçüde iritasyon göstermediğini ortaya koymuştur. Ticari jele kıyasla geliştirilen KLN formülasyonu, sağlam ve yıpranmış tavşan derisinde eritem veya ödem oluşturmamıştır. Bu sonuçlar, Amfoterisin B'nin topikal uygulaması için KLN'lerin etkin olduğunu göstermiştir.

İlave olarak KLN jel formülasyonları ile sürekli bir ilaç salımının sağlandığı gösterilmiştir. Terapötik etkinliğin artması için derideki ilaç konsantrasyonunun yüksek seviyelere ulaşması gerekmektedir. Ticari jel ile karşılaştırıldığında KLN dispersiyon jelleri, daha fazla miktarda ilacın reseptör faza nüfuzunu ve dolayısıyla daha fazla ilacın lokal olarak deride kalmasını sağlamıştır. Bu bağlamda, KLN ile ilacın deride konumlandırılması mümkün görünmektedir. Ticari jel ile deriye nüfuz eden ilaç miktarı daha düşükken, KLN bazlı formülasyon ile bu miktar artmıştır. Veriler, lipit nanopartiküllerin deri yoluyla ilaç geçirgenliğini belirgin düzeyde artırdığını göstermektedir. İlaç permeasyonunda, KLN'lerin hız sınırlayıcı etkilerinden yapısal bileşimlerinin sorumlu olduğu görülmektedir. Amfoterisin B-KLN jel, Amfoterisin B mikroemülsiyonuna kıyasla deride çok daha iyi ilaç tutma özelliği göstermiştir. Mikroemülsiyon ile deride tutulan ilaç miktarı 24 saat sonra yaklaşık % 23 iken KLN jelde % 36,48 olmuştur. Stabilitate çalışmalarında ise, Amfoterisin B-KLN 3 ay süresince başarılı bir stabilite sergilemiştir. Berraklık ve faz ayrışması dikkate alındığında formülasyonda önemli bir değişiklik gözlenmemiştir [301].

Pokharkar ve ark. ilaçla zenginleştirilmiş çekirdek modeli sayesinde 24 saat boyunca kontrollü ilaç salımı gerçekleştiren Benzoil peroksit yüklü KLN geliştirmiştir. KLN matriksinin üretiminde kullanılan katı lipit; Benzoil peroksit için yüksek çözünürlük kapasitesi göstermiş, böylece EE değerini artırmış ve salımı geciktirmiştir. Akne tedavisi için geliştirilen KLN, yüksek lipit içeriği ve nano boyutu (283 nm) sayesinde iyi bir oklüzyon göstermiş ve tavşanlarda eriteme neden olmamıştır. Ticari Benzoil peroksit jel preparatı ise, jelden dermise giren yüksek miktardaki ilaç nedeniyle tavşanlarda yüksek düzeyde irritasyon göstermiştir. Ayrıca KLN, P. acnes'e karşı ticari Benzoil peroksit preparatından daha yüksek oranda antibakteriyel aktivite sergilemiştir [302].

Pinto ve ark. tarafından ayçiçek yağı ile formüle edilerek optimizasyonu gerçekleştirilmiş Retinil palmitat ve  $\alpha$ - tokoferol yüklü NLT formülasyonları hazırlanmıştır. Formülasyon 3B RhE modeline uygulanarak topikal dağılım, irritasyona neden olma potansiyeli ve etkinlik bakımından değerlendirilmiştir. İritasyon testi neticesinde  $\alpha$ -tokoferole maruz kalan hücrelerin canlılığı yüksek bulunmuş (% 96,5  $\pm$  0,2) ve bu aktif maddenin deri üzerinde irritasyon etkisinin olmadığı görülmüştür. Buna karşın, Retinil palmitata (% 38,5  $\pm$  0,3) maruz kalan

dokuların canlılığında %50'nin altında bir azalma gözlenmiştir. Dolayısıyla, Retinil palmitat irritasyon yapıcı olarak sınıflandırılmıştır.

Bununla birlikte, Retinil palmitat-NLT uygulanan dokuların hücre canlılığı % 102,5 ± 1,3 olarak yükselmiştir. Dolayısıyla tek başına Retinil palmitata kıyasla Retinil palmitat-NLT formülasyonunun irritasyon etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Retinil palmitatın enkapsülasyonu ile sitotoksitesi bertaraf edilmektedir. İlave olarak,  $\alpha$ - tokoferol yüklü NLT'nin epidermis yüzeyi boyunca heterojen bir şekilde dağıldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, nanopartiküllerin stratum korneumdaki hücrelerin arasındaki lipit arayüzünde biriktiğini ve bu partiküllerin daha sonra hücreler arası geçiş yolunu izlediğini göstermektedir [50].

Oklüzyon etkisi; derinin su içeriğinin korunmasına neden olmakta böylece stratum korneumun şişerek ilacın geçişini mümkün kılmaktadır [290].

Prabhu ve ark tarafından Kurkumin yüklü KLN hazırlanmış ve KLN'nin Kurkumin'in lipofilikliğini artırarak dokularda alıkonmasını iyileştireceği belirtilmiştir [259].

Lipit nanopartiküllerin özellikle derinin üst katmanlarına penetrasyonu (dermal iletimi) arttırdığı, dolayısıyla ilacın deride kalma süresini uzatabilen bir rezervuar işlevi gördüğü gösterilmiştir. KLN'nin deriden emilimi arttırmasının sebepleri arasında; küçük partikül boyutu sayesinde yüzey alanının geniş olması, oklüzyon etkisi ve yapısındaki yüzey aktif maddelerin varlığı sayılabilmektedir. KLN yapısındaki lipitlerin; derideki subkutan tabakanın hücre dışı boşluklarını doldurmaları ve yoğun lipit yapısını bozmaları neticesinde deri geçirgenliğini arttırdığı düşünülmektedir. Dolayısıyla KLN, deriden ilaç emilimini arttırabilme ve deri üzerinde hedeflendirme sağlamaktadır. Küçük boyutlu KLN'ler, nanopartiküllerin deriye nüfuzunu iyileştirmek üzere avantajlıdır ve kontrollü salım ile deride ilaç birikiminin artmasını sağlayabilmektedir [301].

Küchler ve ark. Morfin yüklü KLN geliştirmiş ve insan kaynaklı 3B modelde (EpiDermFT™) yaranın iyileşmesinde formülasyonun etkisini incelemiştir. Morfin, Morfin yüklü ve boş KLN uygulamalarının reepitelizasyonu hızlandırdığı gözlemlenmiştir. 4 gün sonunda keratinositler yarayı neredeyse tamamen kaplamış fakat boş KLN uygulamasında kapanma gerçekleşmemiştir. Sonuç olarak; yara iyileşmesini hızlandırması, sitotoksitesinin düşük olması ve tam kalınlıktaki RhE

eşdeğerinde de düşük irritasyon ile uzun süreli morfin salımını mümkün kılması KLN'yi yara yönetimi için yenilikçi ve ilginç bir yaklaşım haline getirmektedir [28].

Bir çalışmada, yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği kullanılarak Ketokonazol yüklü KLN'ler (KTZ-KLN) hazırlanmıştır. KTZ-KLN formülasyonları, "kalite tasarımı" yaklaşımı ile hazırlanmış ve Design Expert programı ile optimize edilmiştir. Ayrıca, KTZ-KLN'lerin *in-vitro* sitotoksitesisi ve tavşanlarda *in-vivo* akut dermal toksitesisi incelenerek güvenliği çalışılmıştır.

Tavşanlar; kızarıklık, iltihap, eritem ve ödem (şişmeye neden olan vücut sıvısı birikimi) açısından görsel olarak incelenmiştir. Sonuçlar, geliştirilen formülasyonun irritasyon belirtileri göstermediğini kanıtlayarak güvenli olduğunu ortaya koymuştur. Öte yandan; ticari Ketokonazol ürünü ve serbest Ketokonazol süspansiyonu, uygulama yapılmamış kontrol grubuna kıyasla hafif eriteme neden olmuştur. Son aşamada; KTZ-KLN'lerin internalizasyonunu doğrulamak amacıyla dermal fibroblastlarda KLN'lerin hücresel alımı incelenmiştir.

KTZ yüklü KLN ile geçirgenliğin ve penetrasyonun artması; KLN'nin deri gözeneklerinden geçebilmesi, stratum korneum ile arasındaki lipit etkileşimi, yüzey aktif madde kaynaklı stratum korneumdan lipit ekstraksiyonu ve nanopartiküllerin paraselüler taşınımı gibi birkaç açıdan açıklanabilmektedir. Bu nedenle, ilaç yüklü KLN'nin artmış geçirgenliği ve nüfuzunda birkaç mekanizma birlikte işlev görmektedir [303].

KLN, oda sıcaklığında ve deri yüzey sıcaklığı olan 32 °C'de katı haldeki lipitlerden oluşmaktadır. Bir KLN dispersiyonu veya lipit nanopartikül yüklü krem veya jel deri yüzeyine uygulandığında, parçacık yapısında değişiklikler meydana gelmektedir. Suyun buharlaşması, lipit matriksinin daha düzenli yapıya geçmesine ve böylelikle ilacın dışarı atılmasına neden olmaktadır. Ayrıca, topikal KLN uygulaması ile deri yüzeyinde artan nemlilik kısa süreli ve geçici olarak stratum korneumdaki sert tabakanın sıkı yapısını açarak deri bariyerinin geçirgenliğini arttırmaktadır [34].

Farmasötik uygulamaları göz önünde bulundurulduğunda deri, lipit nanopartiküllerin avantajlarından yararlanılabildiği üzere en sık kullanılan uygulama yoludur. Lipit nanopartiküllerin avantajları arasında; hasarlı lipit tabakasını yeniden güçlendirmeleri, aktif maddelerin penetrasyonunu arttırmaları, deriyi nemlendirerek kırıksıklık derinliğini azaltmaları ve deri elastikiyetini arttırmaları yer almaktadır [255].

Deri hastalıklarında ilaçların topikal uygulamasını kolaylaştırmak üzere yağ içeriği (% 10'dan az) düşük lipit nanopartiküller; sıvı dispersiyonlara, KLN partiküllerinin çözünmesine veya agregat oluşturmaya neden olmayacak krem ya da jel bazlarına dahil edilebilmektedir [34].

Stratum korneum, topikal olarak uygulanan ilaçların perkütan emiliminde ana bariyeri teşkil etmektedir. KLN'nin küçük partikül boyutuna ve nispeten düşük boyut dağılımına sahip olması, deri üzerinde bölgeye özel uygulama yapılmasına olanak tanımakta ve böylece ilaçların deri içerisindeki konsantrasyonunu arttırmaktadır [304].

Esas itibariyle, KLN'nin bir nanotaşıyıcı sistem olarak biyoaktif bileşiklerin irritasyon potansiyelini azalttığı görülmektedir. Bu durum, biyoaktif bileşenlerin biyolojik etkilerini düzenlemede taşıyıcı sistemlerin öneminin vurgulamakla kalmayıp, aynı zamanda muhtemel yan etkileri en aza indirirken terapötik etkinliği en iyi hale getirmeyi amaçlayan topikal ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması açısından da önemli çıkarımlar sunmaktadır.

Bu çıkarımlar, *in-vitro* test yöntemlerinin iyileştirilmesi ve topikal formülasyonların güvenlik profillerinin geliştirilmesi konusunda devam eden tartışmalara katkıda bulunmaktadır.

## 5. SONUÇLAR

Sebepler olduğu kaşıntı, kızarıklık ve yanmayı kapsayan fizyolojik etkilerin yanısıra hastanın ciddi boyutta psikolojik ve sosyal sorunlar yaşamasına neden olmasından ötürü geliştirilen topikal formülasyonların olası deri irritasyonu potansiyelinin saptanması önem teşkil etmektedir. Çalışmamız ile Kurkumin'in ve Turmeron'un irritasyon düzeylerinin azaltılmasına yönelik topikal olarak etkin ve güvenilir bir formülasyonun hazırlanması hedeflenmiştir. Bu doğrultuda hazırlanan Kurkumin ve Turmeron yüklü KLN formülasyonu, literatürde mevcut olmayan çalışmamız ile ilk defa geliştirilmiş özgün bir formülasyondur.

Topikal olarak uygulanması hedeflenen KLN formülasyonunun tasarımı deneysel tasarım çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir. Design Expert yazılımı ile tahmin edilen değerlerin tutarlılığını ve uygulanan yöntemin geçerliliğini tespit etmek üzere laboratuvar ortamında formülasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlardan elde edilen değerler incelendiğinde deneysel verilerin modelin öngörülerini uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Ardından optimizasyonu gerçekleştirilmiş formülasyon için partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli değerlerine dair ölçümler, EE, etken madde miktar tayini, morfolojik analiz, stabilite, *in-vitro* salım ve son olarak *in-vitro* irritasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Optimum formülasyona ait nanopartiküller için boyut dağılımı  $292,11 \pm 9,43$  nm olarak elde edilmiştir.

KLN formülasyonları, 0,3 eşik değerinin altında bir PDI değeri sergilemiştir. Bu değer, KLN'nin partikül boyutu dağılımının amaçlanan doğrultuda dar ve partiküller arasında sınırlı değişkenlik olduğunu göstermektedir.

Optimum KLN formülasyonu,  $-37,8 \pm 1,4$  mV olarak yüksek bir zeta potansiyeli sergilemek suretiyle negatif yüklü bir yüzeye işaret etmiştir. Bu da yüzeyde adsorbe edilmiş iyon veya yüzey aktif madde kaynaklı ek yüklerin varlığına işaret etmektedir.

EE çalışmasından elde edilen bulgular, EE değerinin artırılmasına yönelik KLN formülasyonlarındaki katı lipid ve yüzey aktif madde miktarlarının optimize edilmesinin önemini vurgulamıştır. Kurkumin ve Turmeron için sırasıyla %  $77,21 \pm 4,28$  ve %  $75,12 \pm 2,51$  olarak hesaplanan EE değerlerinin, kayda değer bir oranda olduğu saptanmıştır. Bu değerler, Kurkumin ve Turmeron'un KLN'ye yüksek oranda enkapsüle olma başarısını doğrulamıştır.

Etken madde miktar tayini için gerçekleştirilen deneyler, Kurkumin ve Turmeron için sırasıyla %  $97,21 \pm 0,72$  ve %  $95,45 \pm 1,21$  olmak üzere KLN dispersiyonundan belirgin yüksek geri kazanım oranlarının olduğunu göstermiştir.

*In-vitro* salım çalışması incelendiğinde, ani ilk salımı takip eden kademeli ve sürekli bir salım ile belirgin bir bifazik modelin varlığı ortaya konmuştur. Bu salım profili, hedef bölgeye sürekli bir ilaç kaynağı sağlamakla kalmayıp uygulama sıklığını en aza indirerek hasta uyuncunu arttırmayı mümkün kılabilecektir. Ani salımı takip eden sürekli faz ise, KLN'nin hem acil terapötik etkinlik hem de geniş zaman periyodu içerisinde devam eden etkinlik sağlayacağını göstermektedir.

KLN formülasyonunun morfolojik analizi incelendiğinde ise küresel ve pürüzsüz yüzeye sahip ayırt edici bir morfoloji görülmüştür.

60 gün süresince  $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$  altında yürütülen stabilite çalışmasının verileri, KLN formülasyonunun partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, belirtilen saklama koşulları altında formülasyonun stabilitesini koruyabildiği gözlenmiştir.

Son olarak, EpiDerm™ RhE modeli ile *in-vitro* deri iritasyon çalışması yapılmıştır. Bulgular, negatif kontrol grubu ve boş KLN formülasyonuna kıyasla Kurkumin ve Turmeron karışımı için hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş ve dolayısıyla iritasyon etkisinde artış olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Kurkumin'in ve Turmeron'un KLN formülasyonuna enkapsülasyonu ile dokuların canlılığı anlamlı derecede yükselmiştir. Dolayısıyla KLN'nin iritasyon yapıcı etkilerine dair herhangi bir veri bulunmamıştır. Kurkumin'i ve Turmeron'u birlikte içeren bir nanotaşıyıcı sistem için literatürde EpiDerm™ ile gerçekleştirilmiş bir *in*

*vitro* irritasyon çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamız, bu hususta da özgünlüğünü koruyarak literatüre katkıda bulunmaktadır.

Bu alışma, Kurkumin ve Turmeron'un topikal uygulaması üzerine KLN'yi oldukça umut verici bir nano ölçekli taşıyıcı sistem olarak konumlandırmaktadır. Sonuç olarak, tarafımızca hazırlanan KLN formülasyonuna dair tüm veriler dikkate alındığında Kurkumin'in ve Turmeron'un karışım olarak uygulandığında saptanan irritasyon düzeylerini azaltmak üzere formülasyonun önemli bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, Kurkumin ve Turmeron yüklü KLN'nin irritasyonu en düşük düzeye indirmedeki etkinliğini doğrulamak üzere prelinik ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.



## KAYNAKLAR

- [1] **Nair, A., Chattopadhyay, D. ve Saha, B.** (2019). Plant-derived immunomodulators. *New look to phytomedicine* ss. 435-499): Elsevier.
- [2] **Fuloria, S., Mehta, J., Chandel, A., Sekar, M., Rani, N. N. I. M., Begum, M. Y., ve ark.** (2022). A comprehensive review on the therapeutic potential of *Curcuma longa* Linn. in relation to its major active constituent curcumin. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 820806.
- [3] **Vaughn, A. R., Branum, A. ve Sivamani, R. K.** (2016). Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on skin health: a systematic review of the clinical evidence. *Phytotherapy Research*, 30(8), 1243-1264.
- [4] **Somparn, P., Phisalaphong, C., Nakornchai, S., Unchern, S. ve Morales, N. P.** (2007). Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(1), 74-78.
- [5] **Kundu, J. K., Na, H.-K. ve Surh, Y.-J.** (2009). Ginger-derived phenolic substances with cancer preventive and therapeutic potential. *Food Factors for Health Promotion*, 61, 182-192.
- [6] **Noorafshan, A. ve Ashkani-Esfahani, S.** (2013). A review of therapeutic effects of curcumin. *Current pharmaceutical design*, 19(11), 2032-2046.
- [7] **Waghule, T., Gorantla, S., Rapalli, V. K., Shah, P., Dubey, S. K., Saha, R. N., ve ark.** (2020). Emerging Trends in Topical Delivery of Curcumin Through Lipid Nanocarriers: Effectiveness in Skin Disorders. *AAPS PharmSciTech*, 21(7), 284.
- [8] **Basu, P., Dutta, S., Begum, R., Mittal, S., Dutta, P. D., Bharti, A. C., ve ark.** (2013). Clearance of cervical human papillomavirus infection by topical application of curcumin and curcumin containing polyherbal cream: a phase II randomized controlled study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(10), 5753-5759.
- [9] **Chaudhari, S. P., Tam, A. Y. ve Barr, J. A.** (2015). Curcumin: a contact allergen. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 8(11), 43.
- [10] **Calapai, G., Miroddi, M., Minciullo, P. L., Caputi, A. P., Gangemi, S. ve Schmidt, R. J.** (2014). Contact dermatitis as an adverse reaction to some topically used European herbal medicinal products—part 1: *Achillea millefolium*–*Curcuma longa*. *Contact Dermatitis*, 71(1), 1-12.
- [11] **Thomas, L., Zakir, F., Mirza, M. A., Anwer, M. K., Ahmad, F. J. ve Iqbal, Z.** (2017). Development of Curcumin loaded chitosan polymer based nanoemulsion gel: In vitro, ex vivo evaluation and in vivo wound healing studies. *International journal of biological macromolecules*, 101, 569-579.
- [12] **Vareed, S. K., Kakarala, M., Ruffin, M. T., Crowell, J. A., Normolle, D. P., Djuric, Z., ve ark.** (2008). Pharmacokinetics of curcumin conjugate metabolites in healthy human subjects. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 17(6), 1411-1417.
- [13] **Chen, Z., Quan, L., Zhou, H., Zhao, Y., Chen, P., Hu, L., ve ark.** (2019). Screening of active fractions from *Curcuma Longa Radix* isolated by HPLC

- and GC-MS for promotion of blood circulation and relief of pain. *Journal of ethnopharmacology*, 234, 68-75.
- [14] **Mansi, K., Kumar, R., Jindal, N. ve Singh, K.** (2023). Biocompatible nanocarriers an emerging platform for augmenting the antiviral attributes of bioactive polyphenols: A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 104269.
- [15] **Yang, S., Liu, J., Jiao, J. ve Jiao, L.** (2020). Ar-Turmerone exerts anti-proliferative and anti-inflammatory activities in HaCaT keratinocytes by inactivating hedgehog pathway. *Inflammation*, 43(2), 478-486.
- [16] **Sharma, M., Grewal, K., Jandrotia, R., Batish, D. R., Singh, H. P. ve Kohli, R. K.** (2022). Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112514.
- [17] **Li, Y.-L., Du, Z.-Y., Li, P.-H., Yan, L., Zhou, W., Tang, Y.-D., ve ark.** (2018). Aromatic-turmerone ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like inflammation of BALB/c mice. *International immunopharmacology*, 64, 319-325.
- [18] **Degot, P., Huber, V., Touraud, D. ve Kunz, W.** (2021). Curcumin extracts from *Curcuma Longa*—Improvement of concentration, purity, and stability in food-approved and water-soluble surfactant-free microemulsions. *Food Chemistry*, 339, 128140.
- [19] **Meng, F.-C., Zhou, Y.-Q., Ren, D., Wang, R., Wang, C., Lin, L.-G., ve ark.** (2018). Turmeric: A review of its chemical composition, quality control, bioactivity, and pharmaceutical application. *Natural and artificial flavoring agents and food dyes*, 299-350.
- [20] **Patel, S. ve Gogna, P.** (2015). Tapping botanicals for essential oils: Progress and hurdles in cancer mitigation. *Industrial Crops and Products*, 76, 1148-1163.
- [21] **Villegas, C., Perez, R., Sterner, O., Gonzalez-Chavarria, I. ve Paz, C.** (2021). Curcuma as an adjuvant in colorectal cancer treatment. *Life Sciences*, 286, 120043.
- [22] **Kongpol, K., Sermkaew, N., Makkliang, F., Khongphan, S., Chuaboon, L., Sakdamas, A., ve ark.** (2022). Extraction of curcuminoids and ar-turmerone from turmeric (*Curcuma longa* L.) using hydrophobic deep eutectic solvents (HDESs) and application as HDES-based microemulsions. *Food Chemistry*, 396, 133728.
- [23] **Toden, S., Theiss, A. L., Wang, X. ve Goel, A.** (2017). Essential turmeric oils enhance anti-inflammatory efficacy of curcumin in dextran sulfate sodium-induced colitis. *Scientific reports*, 7(1), 814.
- [24] **Kraisit, P., Hirun, N., Mahadlek, J. ve Limmatvapirat, S.** (2021). Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) as a potential carrier for buccal drug delivery of oral candidiasis treatment using the Box-Behnken design. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102437.
- [25] **Raja, H. N., ud Din, F., Shabbir, K., Khan, S., Alamri, A. H., Al Awadh, A. A., ve ark.** (2023). Sodium alginate-based smart gastro-retentive drug delivery system of revaprazan loaded SLNs; Formulation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127402.
- [26] **Hu, L., Tang, X. ve Cui, F.** (2004). Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(12), 1527-1535.

- [27] **Madureira, A. R., Campos, D. A., Fonte, P., Nunes, S., Reis, F., Gomes, A. M., ve ark.** (2015). Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. *RSC Advances*, 5(29), 22665-22673.
- [28] **Küchler, S., Herrmann, W., Panek-Minkin, G., Blaschke, T., Zoschke, C., Kramer, K. D., ve ark.** (2010). SLN for topical application in skin diseases— Characterization of drug–carrier and carrier–target interactions. *International journal of pharmaceutics*, 390(2), 225-233.
- [29] **Pawar, K. R. ve Babu, R. J.** (2010). Polymeric and lipid-based materials for topical nanoparticle delivery systems. *Critical reviews™ in therapeutic drug carrier systems*, 27(5).
- [30] **Rapalli, V. K., Sharma, S., Roy, A., Alexander, A. ve Singhvi, G.** (2021). Solid lipid nanocarriers embedded hydrogel for topical delivery of apremilast: In-vitro, ex-vivo, dermatopharmacokinetic and anti-psoriatic evaluation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 63, 102442.
- [31] **Liu, M., Sharma, M., Lu, G.-L., Zhang, Z., Yin, N. ve Wen, J.** (2023). Full factorial design, physicochemical characterization, ex vivo investigation, and biological assessment of glutathione-loaded solid lipid nanoparticles for topical application. *International journal of pharmaceutics*, 630, 122381.
- [32] **Gönüllü, Ü., Üner, M., Yener, G., FATMA KARAMAN, E. ve Aydoğmuş, Z.** (2015). Formulation and characterization of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers and nanoemulsion of lornoxicam for transdermal delivery. *Acta Pharmaceutica*, 65(1), 1-13.
- [33] **Souto, E., Wissing, S., Barbosa, C. ve Müller, R.** (2004). Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International journal of pharmaceutics*, 278(1), 71-77.
- [34] **Schäfer-Korting, M., Mehnert, W. ve Korting, H.-C.** (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Advanced drug delivery reviews*, 59(6), 427-443.
- [35] **Pardeike, J., Hommos, A. ve Müller, R. H.** (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International journal of pharmaceutics*, 366(1-2), 170-184.
- [36] **Raina, N., Rani, R., Thakur, V. K. ve Gupta, M.** (2023). New insights in topical drug delivery for skin disorders: from a nanotechnological perspective. *ACS omega*, 8(22), 19145-19167.
- [37] **Hemrajani, C., Negi, P., Parashar, A., Gupta, G., Jha, N. K., Singh, S. K., ve ark.** (2022). Overcoming drug delivery barriers and challenges in topical therapy of atopic dermatitis: A nanotechnological perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 147, 112633.
- [38] **Jain, A. K., Jain, S., Abourehab, M. A., Mehta, P. ve Kesharwani, P.** (2022). An insight on topically applied formulations for management of various skin disorders. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 33(18), 2406-2432.
- [39] **Shah, K. A., Date, A. A., Joshi, M. D. ve Patravale, V. B.** (2007). Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: potential in topical delivery. *International journal of pharmaceutics*, 345(1-2), 163-171.
- [40] **Mandawgade, S. D. ve Patravale, V. B.** (2008). Development of SLNs from natural lipids: application to topical delivery of tretinoin. *International journal of pharmaceutics*, 363(1-2), 132-138.

- [41] **Kaur, K., Jindal, R. ve Jindal, D.** (2018). RSM-CCD optimized microwave-assisted synthesis of chitosan and gelatin-based pH sensitive, inclusion complexes incorporated hydrogels and their use as controlled drug delivery systems. *Journal of drug delivery science and technology*, 48, 161-173.
- [42] **Aksu, B., Paradkar, A., de Matas, M., Özer, Ö., Güneri, T. ve York, P.** (2013). A quality by design approach using artificial intelligence techniques to control the critical quality attributes of ramipril tablets manufactured by wet granulation. *Pharmaceutical development and technology*, 18(1), 236-245.
- [43] **Gonzalez-Mira, E., Egea, M., Souto, E., Calpena, A. ve García, M.** (2010). Optimizing flurbiprofen-loaded NLC by central composite factorial design for ocular delivery. *Nanotechnology*, 22(4), 045101.
- [44] **Varshosaz, J., Ghaffari, S., Khoshayand, M. R., Atyabi, F., Azarmi, S. ve Kobarfard, F.** (2010). Development and optimization of solid lipid nanoparticles of amikacin by central composite design. *Journal of liposome research*, 20(2), 97-104.
- [45] **Ansary, T. M., Hossain, M. R., Kamiya, K., Komine, M. ve Ohtsuki, M.** (2021). Inflammatory molecules associated with ultraviolet radiation-mediated skin aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3974.
- [46] **Dickson, F. M.** (1994) *An Assessment of Skin Irritation Potential Using Human Keratinocytes*: University of Surrey (United Kingdom).
- [47] **Wang, N., Zhao, S., Tian, X., Guang, S. ve Xu, H.** (2022). Fabrication of microspheres containing coagulation factors by reverse microemulsion method for rapid hemostasis and wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 218, 112742.
- [48] **Benson, H. A. ve Watkinson, A. C.** (2012). *Topical and transdermal drug delivery: principles and practice*. John Wiley & Sons.
- [49] **Kottner, J., Beeckman, D., Vogt, A. ve Blume-Peytavi, U.** (2020). Skin health and integrity. *Innovations and Emerging Technologies in Wound Care* ss. 183-196): Elsevier.
- [50] **Pinto, F., Fonseca, L. P., Souza, S., Oliva, A. ve de Barros, D. P.** (2020). Topical distribution and efficiency of nanostructured lipid carriers on a 3D reconstructed human epidermis model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101616.
- [51] **Menon, G. K., Cleary, G. W. ve Lane, M. E.** (2012). The structure and function of the stratum corneum. *International journal of pharmaceuticals*, 435(1), 3-9.
- [52] **McDougal, J. N. ve Rogers, J. V.** (2012). Physiologically based pharmacokinetic modeling of dermal absorption. *Dermatotoxicology* ss. 286-295): CRC Press.
- [53] **Walters, K. A.** (2002). *Dermatological and transdermal formulations*. CRC Press.
- [54] **Yousef, H., Alhajj, M. ve Sharma, S.** (2017). Anatomy, skin (integument), epidermis.
- [55] **Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I. ve Juarranz, Á.** (2016). Anatomy and Function of the Skin. *Nanoscience in dermatology* ss. 1-14): Elsevier.
- [56] **SCHURER, N. Y. ve ELIAS, P. M.** (1991). The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Advances in lipid research*, 24, 27-56.

- [57] **da Costa, P. J. C., de Jesus, A. I. M. ve de Almeida, I. F. M.** (2024). Tissue-based in vitro and ex vivo models for dermal permeability studies. *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* ss. 479-500): Elsevier.
- [58] **Quan, T.** (2023). Molecular insights of human skin epidermal and dermal aging. *Journal of Dermatological Science*.
- [59] **Elmowafy, M.** (2021). Skin penetration/permeation success determinants of nanocarriers: Pursuit of a perfect formulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 203, 111748.
- [60] **Andrews, S. N., Jeong, E. ve Prausnitz, M. R.** (2013). Transdermal delivery of molecules is limited by full epidermis, not just stratum corneum. *Pharmaceutical research*, 30, 1099-1109.
- [61] **Chatterjee, A., Babu, R. J., Klausner, M. ve Singh, M.** (2006). In vitro and in vivo comparison of dermal irritancy of jet fuel exposure using EpiDerm™(EPI-200) cultured human skin and hairless rats. *Toxicology letters*, 167(2), 85-94.
- [62] **Asoh, T., Miyahara, S., Villanueva, S. Y. A. M., Kanemaru, T., Takigawa, T., Mori, H., ve ark.** (2023). Protective role of stratum corneum in percutaneous *Leptospira* infection in a hamster model. *Microbial Pathogenesis*, 182, 106243.
- [63] **Hannen, R., Connelly, J., Myers, S. ve Ojeh, N.** (2023). Skin tissue engineering and keratinocyte stem cell therapy. *Tissue Engineering* ss. 491-532): Elsevier.
- [64] **Hirobe, T.** (2014). Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sinica*, 32(4), 200-204.
- [65] **Henseleit, U., Rosenbach, T. ve Kolde, G.** (1996). Induction of apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *Archives of dermatological research*, 288, 676-683.
- [66] **Jevtić, M., Loewa, A., Nováčková, A., Kováčik, A., Kaessmeyer, S., Erdmann, G., ve ark.** (2020). Impact of intercellular crosstalk between epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on skin homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1867(8), 118722.
- [67] **Ansel, J., Perry, P., Brown, J., Damm, D., Phan, T., Hart, C., ve ark.** (1990). Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *Journal of Investigative Dermatology*, 94(6), s101-s107.
- [68] **Barlow, Y. ve Pye, R. J.** (1997). Keratinocyte culture. *Basic Cell Culture Protocols*, 117-129.
- [69] **Pietramaggiore, G.** (2009). Use of keratinocytes in combination with a dermal replacement to treat skin loss. *Biomaterials for treating skin loss* ss. 207-211): Elsevier.
- [70] **Calabrese, E. J., Dhawan, G., Kapoor, R., Agathokleous, E. ve Calabrese, V.** (2022). Hormesis: Wound healing and keratinocytes. *Pharmacological Research*, 183, 106393.
- [71] **Arda, O., Göksügür, N. ve Tüzün, Y.** (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in dermatology*, 32(1), 3-13.
- [72] **Benson, H. A.** (2012). Skin structure, function, and permeation. *Topical and Transdermal Drug delivery: Principles and practice*, 1-22.
- [73] **Sarmiento, B., Andrade, F., Silva, S. B. d., Rodrigues, F., das Neves, J. ve Ferreira, D.** (2012). Cell-based in vitro models for predicting drug permeability. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 8(5), 607-621.

- [74] **Sharma, M.** (2019). Transdermal and intravenous nano drug delivery systems: present and future. *Applications of targeted nano drugs and delivery systems* ss. 499-550): Elsevier.
- [75] **Kalia, Y. N. ve Guy, R. H.** (2001). Modeling transdermal drug release. *Advanced drug delivery reviews*, 48(2-3), 159-172.
- [76] **Svobodova, L., Kejlova, K., Rucki, M., Chrz, J., Kubincova, P., Dvorakova, M., ve ark.** (2023). Health safety of parabens evaluated by selected in vitro methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 137, 105307.
- [77] **Vinardell, M. ve Mitjans, M.** (2008). Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(1), 46-59.
- [78] **Srisongkram, T., Syahid, N. F., Tookkane, D., Weerapreeyakul, N. ve Puthongking, P.** (2023). Stacked ensemble learning on HaCaT cytotoxicity for skin irritation prediction: A case study on dipterocarpol. *Food and Chemical Toxicology*, 181, 114115.
- [79] **Natsch, A. ve Wasescha, M.** (2007). Fragrance raw materials and essential oils can reduce prostaglandin E2 formation in keratinocytes and reconstituted human epidermis. *International journal of cosmetic science*, 29(5), 369-376.
- [80] **Lawrence, J.** (1997). Application of in vitro human skin models to dermal irritancy: a brief overview and future prospects. *Toxicology in vitro*, 11(3), 305-312.
- [81] **Walters, R. M., Gandolfi, L., Mack, M. C., Fevola, M., Martin, K., Hamilton, M. T., ve ark.** (2016). In vitro assessment of skin irritation potential of surfactant-based formulations by using a 3-D skin reconstructed tissue model and cytokine response. *Alternatives to Laboratory Animals*, 44(6), 523-532.
- [82] **Welss, T., Basketter, D. A. ve Schröder, K. R.** (2004). In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicology in vitro*, 18(3), 231-243.
- [83] **Eskes, C. ve Hofmann, M.** (2017). Overview on current status of alternative methods and testing approaches for skin irritation testing. *Alternatives for Dermal Toxicity Testing*, 3-23.
- [84] **Osborne, R. ve Perkins, M.** (1994). An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Food and Chemical Toxicology*, 32(2), 133-142.
- [85] **Griesinger, C., Barroso, J., Zuang, V., Cole, T., Genschow, E. ve Liebsch, M.** (2009). Explanatory background document to the OECD draft test guideline on in vitro skin irritation testing. *Organisation for economic co-operation and development (OECD)* <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/43670220.pdf>.
- [86] **Hadidi, M., Tan, C., Assadpour, E., Kharazmi, M. S. ve Jafari, S. M.** (2023). Emerging plant proteins as nanocarriers of bioactive compounds. *Journal of Controlled Release*, 355, 327-342.
- [87] **Ingle, A. P., Shende, S., Gupta, I. ve Rai, M.** (2020). Recent trends in the development of nano-bioactive compounds and delivery systems. *Biotechnological Production of Bioactive Compounds* ss. 409-431): Elsevier.
- [88] **Zlabiene, U., Baranauskaite, J., Kopustinskiene, D. M. ve Bernatoniene, J.** (2021). In Vitro and Clinical Safety Assessment of the Multiple W/O/W Emulsion Based on the Active Ingredients from Rosmarinus officinalis L., Avena sativa L. and Linum usitatissimum L. *Pharmaceutics*, 13(5), 732.

- [89] **Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N. ve Ichikawa, H.** (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*, 1-75.
- [90] **Panahi, Y., Fazlollahzadeh, O., Atkin, S. L., Majeed, M., Butler, A. E., Johnston, T. P., ve ark.** (2019). Evidence of curcumin and curcumin analogue effects in skin diseases: A narrative review. *Journal of cellular physiology*, 234(2), 1165-1178.
- [91] **Yen, F.-L., Wu, T.-H., Tzeng, C.-W., Lin, L.-T. ve Lin, C.-C.** (2010). Curcumin nanoparticles improve the physicochemical properties of curcumin and effectively enhance its antioxidant and antihepatoma activities. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(12), 7376-7382.
- [92] **Akbar, M. U., Zia, K. M., Malik, M. I., Zahid, M., Khera, R. A. ve Khaliq, Z.** (2020). Curcumin-based bionanocomposites. *Bionanocomposites* ss. 233-257): Elsevier.
- [93] **Carvalho, A. C., Gomes, A. C., Pereira-Wilson, C. ve Lima, C. F.** (2016). Mechanisms of action of curcumin on aging: nutritional and pharmacological applications. *Molecular Basis of Nutrition and Aging* ss. 491-511): Elsevier.
- [94] **Gera, M., Sharma, N., Ghosh, M., Lee, S. J., Min, T., Kwon, T., ve ark.** (2017). Nanoformulations of curcumin: An emerging paradigm for improved remedial application. *Oncotarget*, 8(39), 66680.
- [95] **Savale, S. K.** (2017). Curcumin as a model drug: conformation, solubility estimation, morphological, in vitro and in vivo biodistribution study. *Journal of PharmaSciTech*, 7, 31-35.
- [96] **Priyadarsini, K. I.** (2009). Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 10(2), 81-95.
- [97] **Hoehle, S. I., Pfeiffer, E., Sólyom, A. M. ve Metzler, M.** (2006). Metabolism of curcuminoids in tissue slices and subcellular fractions from rat liver. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(3), 756-764.
- [98] **Farhat, F., Sohail, S. S., Siddiqui, F., Irshad, R. R. ve Madsen, D. Ø.** (2023). Curcumin in wound healing—a bibliometric analysis. *Life*, 13(1), 143.
- [99] **Abe, Y., Hashimoto, S. ve Horie, T.** (1999). Curcumin inhibition of inflammatory cytokine production by human peripheral blood monocytes and alveolar macrophages. *Pharmacological research*, 39(1), 41-47.
- [100] **Gupta, S. C., Prasad, S., Kim, J. H., Patchva, S., Webb, L. J., Priyadarsini, I. K., ve ark.** (2011). Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*, 28(12), 1937-1955.
- [101] **Mukhopadhyay, A., Basu, N., Ghatak, N. ve Gujral, P.** (1982). Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats. *Agents and actions*, 12, 508-515.
- [102] **Demirovic, D. ve Rattan, S. I.** (2011). Curcumin induces stress response and hormetically modulates wound healing ability of human skin fibroblasts undergoing ageing in vitro. *Biogerontology*, 12, 437-444.
- [103] **Scharstuhl, A., Mutsaers, H., Pennings, S., Szarek, W., Russel, F. ve Wagener, F.** (2009). Curcumin-induced fibroblast apoptosis and in vitro wound contraction are regulated by antioxidants and heme oxygenase: implications for scar formation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(4), 712-725.

- [104] **Phan, T.-T., See, P., Lee, S.-T. ve Chan, S.-Y.** (2001). Protective effects of curcumin against oxidative damage on skin cells in vitro: its implication for wound healing. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 51(5), 927-931.
- [105] **Md Saari, N. H., Chua, L. S., Hasham, R. ve Yuliaty, L.** (2020). Curcumin-loaded nanoemulsion for better cellular permeation. *Scientia Pharmaceutica*, 88(4), 44.
- [106] **Manca, M. L., Castangia, I., Zaru, M., Nácher, A., Valenti, D., Fernández-Busquets, X., ve ark.** (2015). Development of curcumin loaded sodium hyaluronate immobilized vesicles (hyalurosomes) and their potential on skin inflammation and wound restoring. *Biomaterials*, 71, 100-109.
- [107] **Mirzahosseini, M., Khorsandi, K., Hosseinzadeh, R., Ghazaeian, M. ve Shahidi, F. K.** (2020). Antimicrobial photodynamic and wound healing activity of curcumin encapsulated in silica nanoparticles. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 29, 101639.
- [108] **Hu, L., Shi, Y., Li, J. H., Gao, N., Ji, J., Niu, F., ve ark.** (2015). Enhancement of oral bioavailability of curcumin by a novel solid dispersion system. *Aaps Pharmscitech*, 16, 1327-1334.
- [109] **Mangalathillam, S., Rejinold, N. S., Nair, A., Lakshmanan, V.-K., Nair, S. V. ve Jayakumar, R.** (2012). Curcumin loaded chitin nanogels for skin cancer treatment via the transdermal route. *Nanoscale*, 4(1), 239-250.
- [110] **Al-Rohaimi, A. H.** (2015). Comparative anti-inflammatory potential of crystalline and amorphous nano curcumin in topical drug delivery. *Journal of Oleo Science*, 64(1), 27-40.
- [111] **Jeengar, M. K., Rompicharla, S. V. K., Shrivastava, S., Chella, N., Shastri, N. R., Naidu, V., ve ark.** (2016). Emu oil based nano-emulgel for topical delivery of curcumin. *International journal of pharmaceutics*, 506(1-2), 222-236.
- [112] **Patel, N. A., Patel, N. J. ve Patel, R. P.** (2009). Design and evaluation of transdermal drug delivery system for curcumin as an anti-inflammatory drug. *Drug development and industrial pharmacy*, 35(2), 234-242.
- [113] **Hasegawa, T., Nakatani, K., Fujihara, T. ve Yamada, H.** (2015). Aroma of turmeric: Dependence on the combination of groups of several odor constituents. *Natural Product Communications*, 10(6), 1934578X1501000663.
- [114] **Faria, M. J., González-Méijome, J. M., Oliveira, M. E. C. R., Carracedo, G. ve Lúcio, M.** (2024). Recent advances and strategies for nanocarrier-mediated topical therapy and theranostic for posterior eye disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 115321.
- [115] **Huang, M., Sun, Y. ve Tan, C.** (2023). Recent advances in emerging pectin-derived nanocarriers for controlled delivery of bioactive compounds. *Food Hydrocolloids*, 108682.
- [116] **Rawat, M., Singh, D., Saraf, S. ve Saraf, S.** (2006). Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(9), 1790-1798.
- [117] **Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., Assadpour, E. ve Jafari, S. M.** (2020). Evaluating the structural properties of bioactive-loaded nanocarriers with modern analytical tools. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3266-3322.
- [118] **Hou, D., Xie, C., Huang, K. ve Zhu, C.** (2003). The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24(10), 1781-1785.

- [119] **Müller, R. H., Radtke, M. ve Wissing, S. A.** (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced drug delivery reviews*, 54, S131-S155.
- [120] **Kheradmandnia, S., Vasheghani-Farahani, E., Nosrati, M. ve Atyabi, F.** (2010). Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(6), 753-759.
- [121] **McClements, D. J. ve Rao, J.** (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 285-330.
- [122] **Chadha, S.** (2021). Recent advances in nano-encapsulation technologies for controlled release of biostimulants and antimicrobial agents. *Advances in nano-fertilizers and nano-pesticides in agriculture*, 29-55.
- [123] **Stanisic, D., Costa, A. F., Cruz, G., Durán, N. ve Tasic, L.** (2018). Applications of flavonoids, with an emphasis on hesperidin, as anticancer prodrugs: phytotherapy as an alternative to chemotherapy. *Studies in Natural Products Chemistry*, 58, 161-212.
- [124] **de Gomes, M. G., Borges Filho, C. ve Haas, S. E.** (2023). Technological aspects and biological application of nanocapsules loaded with curcumin. *Studies in Natural Products Chemistry*, 79, 119-134.
- [125] **Jenning, V., Schäfer-Korting, M. ve Gohla, S.** (2000). Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. *Journal of controlled release*, 66(2-3), 115-126.
- [126] **Weaver, E., Sommonte, F., Hooker, A., Denora, N., Uddin, S. ve Lamprou, D. A.** (2024). Microfluidic encapsulation of enzymes and steroids within solid lipid nanoparticles. *Drug Delivery and Translational Research*, 14(1), 266-279.
- [127] **Egbuna, C., Găman, M.-A. ve Jeevanandam, J.** (2022). *Applications of nanotechnology in drug discovery and delivery*. Elsevier.
- [128] **Baruah, U. K., Gowthamarajan, K., Vanka, R., Karri, V. V. S. R., Selvaraj, K. ve Jojo, G. M.** (2017). Malaria treatment using novel nano-based drug delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 25(7), 567-581.
- [129] **Saupe, A. ve Rades, T.** (2006). Solid lipid nanoparticles. *Nanocarrier technologies: Frontiers of nanotherapy* ss. 41-50): Springer.
- [130] **Severino, P., Andreani, T., Macedo, A. S., Fangueiro, J. F., Santana, M. H. A., Silva, A. M., ve ark.** (2012). Current state-of-art and new trends on lipid nanoparticles (SLN and NLC) for oral drug delivery. *Journal of drug delivery*, 2012(1), 750891.
- [131] **Gunawan, M. ve Boonkanokwong, V.** (2023). Current applications of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as vehicles in oral delivery systems for antioxidant nutraceuticals: A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113608.
- [132] **Mehnert, W. ve Mäder, K.** (2012). Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 83-101.
- [133] **Souto, E. B., Baldim, I., Oliveira, W. P., Rao, R., Yadav, N., Gama, F. M., ve ark.** (2020). SLN and NLC for topical, dermal, and transdermal drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 17(3), 357-377.
- [134] **Parhi, R. ve Suresh, P.** (2012). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles—a review. *Current drug discovery technologies*, 9(1), 2-16.

- [135] **Alhakamy, N. A., Hosny, K. M., Aldryhim, A. Y., Rizg, W. Y., Eshmawi, B. A., Bukhary, H. A., ve ark.** (2022). Development and optimization of ofloxacin as solid lipid nanoparticles for enhancement of its ocular activity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 72, 103373.
- [136] **Liedtke, S., Wissing, S., Müller, R. ve Mäder, K.** (2000). Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersions characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(2), 183-185.
- [137] **Kotmakçı, M., Akbaba, H., Erel, G., Ertan, G. ve Kantarcı, G.** (2017). Improved method for solid lipid nanoparticle preparation based on hot microemulsions: preparation, characterization, cytotoxicity, and hemocompatibility evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 18, 1355-1365.
- [138] **Boonme, P., Souto, E. B., Wuttisantikul, N., Jongjit, T. ve Pichayakorn, W.** (2013). Influence of lipids on the properties of solid lipid nanoparticles from microemulsion technique. *European journal of lipid science and technology*, 115(7), 820-824.
- [139] **Luo, Y., Chen, D., Ren, L., Zhao, X. ve Qin, J.** (2006). Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *Journal of controlled release*, 114(1), 53-59.
- [140] **Mukherjee, S., Ray, S. ve Thakur, R.** (2009). Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 71(4), 349.
- [141] **Subramanian, P.** (2021). Lipid-based nanocarrier system for the effective delivery of nutraceuticals. *Molecules*, 26(18), 5510.
- [142] **Silva, A. C., González-Mira, E., García, M., Egea, M., Fonseca, J., Silva, R., ve ark.** (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(1), 158-165.
- [143] **Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T. ve Awad, T.** (2008). Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food biophysics*, 3, 146-154.
- [144] **Freitas, C. ve Müller, R.** (1999). Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) and crystallinity of the lipid phase. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 47(2), 125-132.
- [145] **Schwarz, C. ve Mehnert, W.** (1997). Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International journal of pharmaceutics*, 157(2), 171-179.
- [146] **Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J. ve Müller, R.** (1994). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release*, 30(1), 83-96.
- [147] **Kathe, N., Henriksen, B. ve Chauhan, H.** (2014). Physicochemical characterization techniques for solid lipid nanoparticles: principles and limitations. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(12), 1565-1575.
- [148] **Triplett, M. D. ve Rathman, J. F.** (2009). Optimization of  $\beta$ -carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique. *Journal of nanoparticle research*, 11, 601-614.
- [149] **Tscharnuter, W.** (2006). Photon correlation spectroscopy in particle sizing. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory and instrumentation*.

- [150] Freitas, C. ve Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN™) dispersions. *International journal of pharmaceutics*, 168(2), 221-229.
- [151] Daneshmand, S., Golmohammadzadeh, S., Jaafari, M. R., Movaffagh, J., Rezaee, M., Sahebkar, A., ve ark. (2018). Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. *Journal of cellular biochemistry*, 119(6), 4251-4264.
- [152] Battaglia, L. ve Gallarate, M. (2012). Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 9(5), 497-508.
- [153] Müller, R. H., Mäder, K. ve Gohla, S. (2000). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 50(1), 161-177.
- [154] Venkateswarlu, V. ve Manjunath, K. (2004). Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of controlled release*, 95(3), 627-638.
- [155] Bunjes, H. (2010). Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1637-1645.
- [156] Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J. ve Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 29-43.
- [157] Shah, R. M., Malherbe, F., Eldridge, D., Palombo, E. A. ve Harding, I. H. (2014). Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *Journal of colloid and interface science*, 428, 286-294.
- [158] Katouzian, I., Esfanjani, A. F., Jafari, S. M. ve Akhavan, S. (2017). Formulation and application of a new generation of lipid nano-carriers for the food bioactive ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 14-25.
- [159] Trombino, S., Cassano, R., Muzzalupo, R., Pingitore, A., Cione, E. ve Picci, N. (2009). Stearyl ferulate-based solid lipid nanoparticles for the encapsulation and stabilization of  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -tocopherol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(2), 181-187.
- [160] Üner, M. (2006). Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Die pharmazie-an international journal of pharmaceutical sciences*, 61(5), 375-386.
- [161] Lippacher, A., Müller, R. ve Mäder, K. (2001). Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 214(1-2), 9-12.
- [162] Schlupp, P., Blaschke, T., Kramer, K., Höltje, H.-D., Mehnert, W. ve Schäfer-Korting, M. (2011). Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids. *Skin pharmacology and physiology*, 24(4), 199-209.
- [163] Zhou, X., Hao, Y., Yuan, L., Pradhan, S., Shrestha, K., Pradhan, O., ve ark. (2018). Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review. *Chinese Chemical Letters*, 29(12), 1713-1724.
- [164] Vogt, F. G. ve Kord, A. S. (2011). Development of quality-by-design analytical methods. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(3), 797-812.

- [165] Sangshetti, J. N., Deshpande, M., Zaheer, Z., Shinde, D. B. ve Arote, R. (2017). Quality by design approach: Regulatory need. *Arabian Journal of chemistry*, 10, S3412-S3425.
- [166] Verma, S., Lan, Y., Gokhale, R. ve Burgess, D. J. (2009). Quality by design approach to understand the process of nanosuspension preparation. *International journal of pharmaceuticals*, 377(1-2), 185-198.
- [167] Rathore, A. S. ve Winkle, H. (2009). Quality by design for biopharmaceuticals. *Nature biotechnology*, 27(1), 26-34.
- [168] Gujral, G., Kapoor, D. ve Jaimini, M. (2018). An updated review on design of experiment (DOE) in pharmaceuticals. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(3), 147-152.
- [169] Dong, Y., Georgakis, C., Mustakis, J., Hawkins, J. M., Han, L., Wang, K., ve ark. (2019). Constrained version of the dynamic response surface methodology for modeling pharmaceutical reactions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(30), 13611-13621.
- [170] Pramod, K., Tahir, M. A., Charoo, N. A., Ansari, S. H. ve Ali, J. (2016). Pharmaceutical product development: A quality by design approach. *International journal of pharmaceutical investigation*, 6(3), 129.
- [171] Mahapatra, A. P. K., Saraswat, R., Botre, M., Paul, B. ve Prasad, N. (2020). Application of response surface methodology (RSM) in statistical optimization and pharmaceutical characterization of a patient compliance effervescent tablet formulation of an antiepileptic drug levetiracetam. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 1-14.
- [172] Bhattacharya, S. (2021). Central composite design for response surface methodology and its application in pharmacy. *Response surface methodology in engineering science*: IntechOpen.
- [173] Khuri, A. I. ve Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. *Wiley interdisciplinary reviews: Computational statistics*, 2(2), 128-149.
- [174] Alépée, N., Tornier, C., Robert, C., Amsellem, C., Roux, M.-H., Doucet, O., ve ark. (2010). A catch-up validation study on reconstructed human epidermis (SkinEthic™ RHE) for full replacement of the Draize skin irritation test. *Toxicology in Vitro*, 24(1), 257-266.
- [175] Hoffmann, S., Cole, T. ve Hartung, T. (2005). Skin irritation: prevalence, variability, and regulatory classification of existing in vivo data from industrial chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 41(3), 159-166.
- [176] Charmeau-Genevois, C., Sarang, S., Perea, M., Eadsforth, C., Austin, T. ve Thomas, P. (2021). A simplified index to quantify the irritation/corrosion potential of chemicals—Part I: Skin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 123, 104922.
- [177] Auton, T., Botham, P. ve Kimber, I. (1995). Retrospective appraisal of the relationship between skin irritancy and contact sensitization potential. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 46(2), 149-154.
- [178] Calvin, G. (1992). New approaches to the assessment of eye and skin irritation. *Toxicology letters*, 64, 157-164.
- [179] Osborne, R., Perkins, M. A. ve Roberts, D. A. (1995). Development and intralaboratory evaluation of an in vitro human cell-based test to aid ocular irritancy assessments. *Fundamental and Applied Toxicology*, 28(1), 139-153.

- [180] **Draize, J. H.** (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and the mucous membranes. *J Pharmacol Exp Ther*, 82, 377-390.
- [181] **OECD.** 2015. Test guideline no. 404: acute dermal irritation/corrosion. OECD guidelines for the testing of chemicals. Organisation for Economic Cooperation and Development Paris; s.
- [182] **Espersen, R., Olsen, P., Nicolaisen, G., Jensen, B. ve Rasmussen, E.** (1997). Assessment of recovery from ocular irritancy using a human tissue equivalent model. *Toxicology in vitro*, 11(1-2), 81-88.
- [183] **Eun, H. C. ve Suh, D. H.** (2000). Comprehensive outlook of in vitro tests for assessing skin irritancy as alternatives to Draize tests. *Journal of dermatological science*, 24(2), 77-91.
- [184] **Erkekoğlu, P. ve Baydar, T.** (2021). Güncel in vitro sitotoksikite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41(1), 45-63.
- [185] **Sanchez, L., Mitjans, M., Infante, M. R. ve Vinardell, M. P.** (2006). Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicology letters*, 161(1), 53-60.
- [186] **Osborne, R. ve Perkins, M.** (1991). In vitro skin irritation testing with human skin cell cultures. *Toxicology in Vitro*, 5(5-6), 563-567.
- [187] **Wilhelm, K. P., Samblebe, M. ve Siegers, C. P.** (1994). Quantitative in vitro assessment of N-alkyl sulphate-induced cytotoxicity in human keratinocytes (HaCaT). Comparison with in vivo human irritation tests. *British journal of dermatology*, 130(1), 18-23.
- [188] **ŞENKAL, S., BURUKÇU, D., HAYAL, T. B., KIRATLI, B., ŞİŞLİ, H. B., SAĞRAÇ, D., ve ark.** (2022). 3D Culture Of HaCaT Keratinocyte Cell Line as an in vitro Toxicity Model. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 23(2), 211-220.
- [189] **Mosmann, T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- [190] **Salerno, S., Messina, A., Giordano, F., Bader, A., Drioli, E. ve De Bartolo, L.** (2017). Dermal-epidermal membrane systems by using human keratinocytes and mesenchymal stem cells isolated from dermis. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 943-953.
- [191] **Lovett, M. L., Nieland, T. J., Dingle, Y. T. L. ve Kaplan, D. L.** (2020). Innovations in 3D tissue models of human brain physiology and diseases. *Advanced functional materials*, 30(44), 1909146.
- [192] **Moysidou, C.-M., Barberio, C. ve Owens, R. M.** (2021). Advances in engineering human tissue models. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 620962.
- [193] **Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., ve ark.** (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiology*, 32(4), 266-277.
- [194] **Bhar, B., Das, E., Manikumar, K. ve Mandal, B. B.** (2024). 3D Bioprinted Human Skin Model Recapitulating Native-like Tissue Maturation and Immunocompetence as an Advanced Platform for Skin Sensitization Assessment. *Advanced Healthcare Materials*, 2303312.
- [195] **Rouwkema, J., Gibbs, S., Lutolf, M. P., Martin, I., Vunjak-Novakovic, G. ve Malda, J.** (2011). In vitro platforms for tissue engineering: implications for

basic research and clinical translation. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5(8), e164-e167.

- [196] **Park, S. ve Park, K. M.** (2016). Engineered polymeric hydrogels for 3D tissue models. *Polymers*, 8(1), 23.
- [197] **Wilhelm, K. P., Böttjer, B. ve Siegers, C. P.** (2001). Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests. *British Journal of Dermatology*, 145(5), 709-715.
- [198] **Nam, K.-H., Smith, A. S., Lone, S., Kwon, S. ve Kim, D.-H.** (2015). Biomimetic 3D tissue models for advanced high-throughput drug screening. *Journal of laboratory automation*, 20(3), 201-215.
- [199] **Huh, D., Torisawa, Y.-s., Hamilton, G. A., Kim, H. J. ve Ingber, D. E.** (2012). Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips. *Lab on a Chip*, 12(12), 2156-2164.
- [200] **Jang, J., Yi, H.-G. ve Cho, D.-W.** (2016). 3D printed tissue models: present and future. *ACS biomaterials science & engineering*, 2(10), 1722-1731.
- [201] **Balls, M., Combes, R. ve Worth, A.** (2018). *The history of alternative test methods in toxicology*. Academic Press.
- [202] **Frankowski, J., Kurzątkowska, M., Sobczak, M. ve Piotrowska, U.** (2023). Utilization of 3D bioprinting technology in creating human tissue and organoid models for preclinical drug research-state-of-the-art. *International Journal of Pharmaceutics*, 123313.
- [203] **Madi, M., Rols, M.-P. ve Gibot, L.** (2015). Efficient in vitro electropermeabilization of reconstructed human dermal tissue. *The Journal of Membrane Biology*, 248, 903-908.
- [204] **Choe, M. M., Tomei, A. A. ve Swartz, M. A.** (2006). Physiological 3D tissue model of the airway wall and mucosa. *Nature protocols*, 1(1), 357-362.
- [205] **Carlson, M. W., Alt-Holland, A., Egles, C. ve Garlick, J. A.** (2008). Three-dimensional tissue models of normal and diseased skin. *Current Protocols in Cell Biology*, 41(1), 19.19. 11-19.19. 17.
- [206] **Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Bouwstra, J. ve Mommaas, M.** (2000). Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. *International journal of pharmaceutics*, 203(1-2), 211-225.
- [207] **Ram, J. L. ve Conn, P. M.** (2018). *Conn's handbook of models for human aging*. Academic Press.
- [208] **Albérola, G., Bellard, E., Kolosnjaj-Tabi, J., Guard, J., Golzio, M. ve Rols, M.-P.** (2024). Fibroblasts transfection by electroporation in 3D reconstructed human dermal tissue. *Bioelectrochemistry*, 108670.
- [209] **Canavez, A. d. P. M., Silveira, T. M., Vita, N. d. A., Weihermann, A. C., Neumann, C. R., Schuck, D. C., ve ark.** (2017). Integrated Safety Strategy for the Development of Children's Cosmetic Products Using In Vitro and Clinical Methodologies. *Alternatives for Dermal Toxicity Testing* ss. 565-577): Springer.
- [210] **Eskes, C., Van Vliet, E., Maibach, H. I. ve Goldberg, A. M.** Alternatives for dermal toxicity testing. Springer; 2017.
- [211] **Botham, P. A., Earl, L. K., Fentem, J. H., Roguet, R. ve Van De Sandt, J. J.** (1998). Alternative methods for skin irritation testing: the current status: ECVAM skin irritation task force report 1. *Alternatives to Laboratory Animals*, 26(2), 195-211.

- [212] **MacGregor, J. T., Collins, J. M., Sugiyama, Y., Tyson, C. A., Dean, J., Smith, L., ve ark.** (2001). In vitro human tissue models in risk assessment: report of a consensus-building workshop. *Toxicological Sciences*, 59(1), 17-36.
- [213] **Asselineau, D., Bernard, B., Bailly, C. ve Darmon, Y.** (1986). Three-dimensional culture of human keratinocytes on a dermal equivalent as a model system to study environmental modulation of epidermal physiology in vitro: effect of air-exposure. *British Journal of Dermatology*, 115(s31), 126-127.
- [214] **Nagasawa, M., Hayashi, H. ve Nakayoshi, T.** (2002). In vitro evaluation of skin sensitivity of povidone-iodine and other antiseptics using a three-dimensional human skin model. *Dermatology*, 204(Suppl. 1), 109-113.
- [215] **Yuki, K., Ikeda, N., Nishiyama, N. ve Kasamatsu, T.** (2013). The reconstructed skin micronucleus assay in EpiDerm™: reduction of false-positive results—a mechanistic study with epigallocatechin gallate. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 757(2), 148-157.
- [216] **Almeida, A., Sarmiento, B. ve Rodrigues, F.** (2017). Insights on in vitro models for safety and toxicity assessment of cosmetic ingredients. *International journal of pharmaceutics*, 519(1-2), 178-185.
- [217] **Cannon, C., Neal, P., Southee, J., Kubilus, J. ve Klausner, M.** (1994). New epidermal model for dermal irritancy testing. *Toxicology in Vitro*, 8(4), 889-891.
- [218] **Kandarova, H., Willoughby, J. A., De Jong, W. H., Letasiova, S., Milasova, T., Bachelor, M. A., ve ark.** (2018). Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™. *Toxicology in Vitro*, 50, 407-417.
- [219] **Boelsma, E., Gibbs, S., Faller, C. ve Ponec, M.** (2000). Characterization and comparison of reconstructed skin models: morphological and immunohistochemical evaluation. *Acta Derma-Venereologica*, 80, 82-88.
- [220] **Klausner, M., Neal, P., Cannon, C., Kubilus, J., Curren, R. ve Harbell, J.** (1997). Intra- and interlaboratory reproducibility of EpiDerm, an in vitro model for dermal irritancy testing. *Advances in Animal Alternatives for Safety and Efficacy Testing*, eds Salem, H, Katz, SA, Taylor & Francis, Washington, DC, 347-357.
- [221] **Netzaff, F., Lehr, C.-M., Wertz, P. W. ve Schaefer, U. F.** (2005). The human epidermis models EpiSkin (R), SkinEthic (R) and EpiDerm (R): An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 167-178.
- [222] **Ponec, M., Boelsma, E., Gibbs, S. ve Mommaas, M.** (2002). Characterization of reconstructed skin models. *Skin Pharmacology and Physiology*, 15(Suppl. 1), 4-17.
- [223] **Hayden, P. J.** (1996). Cytokine and lipid mediator release from in vitro skin models following detergent treatment or physical wounding. *Journal of Investigative Dermatology*, 4(106), 936.
- [224] **Gerberick, G. F. ve Sikorski, E. E.** (1998). In vitro and in vivo testing techniques for allergic contact dermatitis. *American Journal of Contact Dermatitis*, 9(2), 111-118.
- [225] **Kandárová, H., Hayden, P., Klausner, M., Kubilus, J., Kearney, P. ve Sheasgreen, J.** (2009). In vitro skin irritation testing: improving the sensitivity

- of the EpiDerm skin irritation test protocol. *Alternatives to Laboratory Animals*, 37(6), 671-689.
- [226] **Kandarova, H. ve Liebsch, M.** (2017). The EpiDerm™ Skin Irritation Test (EpiDerm™ SIT). *Alternatives for Dermal Toxicity Testing*, 41-57.
- [227] **Puglia, C., Offerta, A., Rizza, L., Zingale, G., Bonina, F. ve Ronsisvalle, S.** (2013). Optimization of curcumin loaded lipid nanoparticles formulated using high shear homogenization (HSH) and ultrasonication (US) methods. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 13(10), 6888-6893.
- [228] **Cortial, A., Vocanson, M., Loubry, E. ve Briancon, S.** (2015). Hot homogenization process optimization for fragrance encapsulation in solid lipid nanoparticles. *Flavour and fragrance journal*, 30(6), 467-477.
- [229] **Rosa, A., Nieddu, M., Pitzanti, G., Pireddu, R., Lai, F. ve Cardia, M. C.** (2023). Impact of solid lipid nanoparticles on 3T3 fibroblasts viability and lipid profile: The effect of curcumin and resveratrol loading. *Journal of Applied Toxicology*, 43(2), 272-286.
- [230] **Behbahani, E. S., Ghaedi, M., Abbaspour, M. ve Rostamizadeh, K.** (2017). Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. *Ultrasonics sonochemistry*, 38, 271-280.
- [231] **Dourado, D., de Oliveira, M. C., de Araujo, G. R. S., Amaral-Machado, L., Porto, D. L., Aragão, C. F. S., ve ark.** (2022). Low-surfactant microemulsion, a smart strategy intended for curcumin oral delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 652, 129720.
- [232] **Ghadiri, M., Fatemi, S., Vatanara, A., Doroud, D., Najafabadi, A. R., Darabi, M., ve ark.** (2012). Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. *International journal of pharmaceutics*, 424(1-2), 128-137.
- [233] **Shrotriya, S., Ranpise, N., Satpute, P. ve Vidhate, B.** (2018). Skin targeting of curcumin solid lipid nanoparticles-engrossed topical gel for the treatment of pigmentation and irritant contact dermatitis. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(7), 1471-1482.
- [234] **Hassan, H., Adam, S. K., Alias, E., Meor Mohd Affandi, M. M. R., Shamsuddin, A. F. ve Basir, R.** (2021). Central composite design for formulation and optimization of solid lipid nanoparticles to enhance oral bioavailability of acyclovir. *Molecules*, 26(18), 5432.
- [235] **Lin, X., Li, X., Zheng, L., Yu, L., Zhang, Q. ve Liu, W.** (2007). Preparation and characterization of monocaprato nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 311(1-3), 106-111.
- [236] **Kushwaha, A. K., Vuddanda, P. R., Karunanidhi, P., Singh, S. K. ve Singh, S.** (2013). Development and evaluation of solid lipid nanoparticles of raloxifene hydrochloride for enhanced bioavailability. *BioMed research international*, 2013.
- [237] **Jourghanian, P., Ghaffari, S., Ardjmand, M., Haghghat, S. ve Mohammadnejad, M.** (2016). Sustained release curcumin loaded solid lipid nanoparticles. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(1), 17.
- [238] **Sastri, K. T., Radha, G. V., Pidikiti, S. ve Vajjhala, P.** (2020). Solid lipid nanoparticles: Preparation techniques, their characterization, and an update on recent studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 10(6), 126-141.

- [239] **Amelian, A., Wasilewska, K., Megias, D. ve Winnicka, K.** (2017). Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. *Pharmacological Reports*, 69(5), 861-870.
- [240] **Kidd, D. A., Johnson, M. ve Clements, J.** (2007). Development of an in vitro corrosion/irritation prediction assay using the EpiDerm™ skin model. *Toxicology in vitro*, 21(7), 1292-1297.
- [241] **OECD.** (2021). *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method.*
- [242] **Kandárová, H., Hayden, P., Klausner, M., Kubilus, J. ve Sheasgreen, J.** (2009). An in vitro skin irritation test (SIT) using the EpiDerm reconstructed human epidermal (RHE) model. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (29), e1366.
- [243] **Li, L., Mou, X., Xie, H., Zhang, A., Li, J., Wang, R., ve ark.** (2023). In vitro tests to evaluate embryotoxicity and irritation of Chinese herbal medicine (Pentaherbs formulation) for atopic dermatitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 305, 116149.
- [244] **David, V., Moldoveanu, S. C. ve Galaon, T.** (2021). Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis. *Biomedical Chromatography*, 35(1), e5008.
- [245] **Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L. ve Sakariah, K. K.** (2002). Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(13), 3668-3672.
- [246] **Desai, N., Momin, M., Singh, U., Khan, T. ve Sherje, A.** (2019). Analytical method development and validation for simultaneous estimation of curcumin and cyclosporine by RP-HPLC. *Int J Pharm Pharm Sci*, 11, 26-33.
- [247] **Jadhav, B.-K., Mahadik, K.-R. ve Paradkar, A.-R.** (2007). Development and validation of improved reversed phase-HPLC method for simultaneous determination of curcumin, demethoxycurcumin and bis-demethoxycurcumin. *Chromatographia*, 65, 483-488.
- [248] **Li, J., Jiang, Y., Wen, J., Fan, G., Wu, Y. ve Zhang, C.** (2009). A rapid and simple HPLC method for the determination of curcumin in rat plasma: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study of curcumin liposome. *Biomedical chromatography*, 23(11), 1201-1207.
- [249] **Dhingra, O. D., Jham, G. N., Barcelos, R. C., Mendonça, F. A. ve Ghiviriga, I.** (2007). Isolation and identification of the principal fungitoxic component of turmeric essential oil. *Journal of Essential Oil Research*, 19(4), 387-391.
- [250] **Li, R., Xiang, C., Zhang, X., Guo, A. ve Ye, M.** (2010). Chemical analysis of the Chinese herbal medicine turmeric (*Curcuma longa* L.). *Current Pharmaceutical Analysis*, 6(4), 256-268.
- [251] **Chao, I.-C., Wang, C.-M., Li, S.-P., Lin, L.-G., Ye, W.-C. ve Zhang, Q.-W.** (2018). Simultaneous quantification of three curcuminoids and three volatile components of curcuma longa using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography. *Molecules*, 23(7), 1568.
- [252] **Sun, J., Bi, C., Chan, H. M., Sun, S., Zhang, Q. ve Zheng, Y.** (2013). Curcumin-loaded solid lipid nanoparticles have prolonged in vitro antitumour activity, cellular uptake and improved in vivo bioavailability. *Colloids and surfaces b: biointerfaces*, 111, 367-375.

- [253] **Righeschi, C., Bergonzi, M. C., Isacchi, B., Bazzicalupi, C., Gratteri, P. ve Bilia, A. R.** (2016). Enhanced curcumin permeability by SLN formulation: The PAMPA approach. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 475-483.
- [254] **Vidlářová, L., Romero, G. B., Hanuš, J., Štěpánek, F. ve Müller, R. H.** (2016). Nanocrystals for dermal penetration enhancement—Effect of concentration and underlying mechanisms using curcumin as model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 104, 216-225.
- [255] **Kovačević, A. B., Müller, R. H., Savić, S. D., Vuleta, G. M. ve Keck, C. M.** (2014). Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 444, 15-25.
- [256] **Wang, X., Liu, J., Ma, Y., Cui, X., Chen, C., Zhu, G., ve ark.** (2023). Development of A Nanostructured Lipid Carrier-Based Drug Delivery Strategy for Apigenin: Experimental Design Based on CCD-RSM and Evaluation against NSCLC In Vitro. *Molecules*, 28(18), 6668.
- [257] **Hao, J., Wang, F., Wang, X., Zhang, D., Bi, Y., Gao, Y., ve ark.** (2012). Development and optimization of baicalin-loaded solid lipid nanoparticles prepared by coacervation method using central composite design. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(2), 497-505.
- [258] **Priyanka, K., Sahu, P. L. ve Singh, S.** (2018). Optimization of processing parameters for the development of Ficus religiosa L. extract loaded solid lipid nanoparticles using central composite design and evaluation of antidiabetic efficacy. *Journal of drug delivery science and technology*, 43, 94-102.
- [259] **Prabhu, A., Jose, J., Kumar, L., Salwa, S., Vijay Kumar, M. ve Nabavi, S. M.** (2022). Transdermal delivery of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles as microneedle patch: An in vitro and in vivo study. *AAPS PharmSciTech*, 23, 1-12.
- [260] **Patel, D. K., Kesharwani, R. ve Kumar, V.** (2020). Etodolac loaded solid lipid nanoparticle based topical gel for enhanced skin delivery. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101810.
- [261] **de Carvalho, S. M., Noronha, C. M., Floriani, C. L., Lino, R. C., Rocha, G., Bellettini, I. C., ve ark.** (2013). Optimization of  $\alpha$ -tocopherol loaded solid lipid nanoparticles by central composite design. *Industrial Crops and Products*, 49, 278-285.
- [262] **Nair, R., Kumar, A. C., Priya, V. K., Yadav, C. M. ve Raju, P. Y.** (2012). Formulation and evaluation of chitosan solid lipid nanoparticles of carbamazepine. *Lipids in health and disease*, 11(1), 72.
- [263] **Musielak, E., Feliczak-Guzik, A. ve Nowak, I.** (2022). Optimization of the conditions of solid lipid nanoparticles (SLN) synthesis. *Molecules*, 27(7), 2202.
- [264] **Dolatabadi, S., Karimi, M., Nasirizadeh, S., Hatamipour, M., Golmohammadzadeh, S. ve Jaafari, M. R.** (2021). Preparation, characterization and in vivo pharmacokinetic evaluation of curcuminoids-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 62, 102352.
- [265] **Sakellari, G. I., Zafeiri, I., Batchelor, H. ve Spyropoulos, F.** (2021). Formulation design, production and characterisation of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for the

- encapsulation of a model hydrophobic active. *Food hydrocolloids for health*, 1, 100024.
- [266] **Rahmanian-Devin, P., Askari, V. R., Sanei-Far, Z., Rahimi, V. B., Kamali, H., Jaafari, M. R., ve ark.** (2023). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles encapsulated nospapine and evaluation of its protective effects against imiquimod-induced psoriasis-like skin lesions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168, 115823.
- [267] **Doktorovova, S., Souto, E. B. ve Silva, A. M.** (2018). Hansen solubility parameters (HSP) for prescreening formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): In vitro testing of curcumin-loaded SLN in MCF-7 and BT-474 cell lines. *Pharmaceutical development and technology*, 23(1), 96-105.
- [268] **Emami, J., Mohiti, H., Hamishehkar, H. ve Varshosaz, J.** (2015). Formulation and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for pulmonary delivery of budesonide using Taguchi and Box-Behnken design. *Research in pharmaceutical sciences*, 10(1), 17.
- [269] **Ekambaram, P. ve Sathali, A. A. H.** (2011). Formulation and evaluation of solid lipid nanoparticles of ramipril. *Journal of young pharmacists*, 3(3), 216-220.
- [270] **Tiyaboonchai, W., Tungpradit, W. ve Plianbangchang, P.** (2007). Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*, 337(1-2), 299-306.
- [271] **Patra, S., Dey, J. ve Chakraborty, A.** (2023). Physicochemical Characterization, Stability, and In Vitro Evaluation of Curcumin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Prepared Using Biocompatible Synthetic Lipids. *ACS Applied Bio Materials*, 6(7), 2785-2794.
- [272] **Adib, Z. M., Ghanbarzadeh, S., Kouhsoltani, M., Khosroshahi, A. Y. ve Hamishehkar, H.** (2016). The effect of particle size on the deposition of solid lipid nanoparticles in different skin layers: a histological study. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 6(1), 31.
- [273] **Durán-Lobato, M., Enguix-González, A., Fernández-Arévalo, M. ve Martín-Banderas, L.** (2013). Statistical analysis of solid lipid nanoparticles produced by high-pressure homogenization: a practical prediction approach. *Journal of nanoparticle research*, 15, 1-14.
- [274] **Kovacevic, A., Savic, S., Vuleta, G., Mueller, R. H. ve Keck, C. M.** (2011). Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International journal of pharmaceutics*, 406(1-2), 163-172.
- [275] **Kakkar, V., Singh, S., Singla, D. ve Kaur, I. P.** (2011). Exploring solid lipid nanoparticles to enhance the oral bioavailability of curcumin. *Molecular nutrition & food research*, 55(3), 495-503.
- [276] **Santonocito, D., Sarpietro, M. G., Carbone, C., Panico, A., Campisi, A., Siciliano, E. A., ve ark.** (2020). Curcumin containing PEGylated solid lipid nanoparticles for systemic administration: A preliminary study. *Molecules*, 25(13), 2991.
- [277] **Sindhu, M., Rajkumar, V., Annapoorani, C. A., Gunasekaran, C. ve Kannan, M.** (2023). Functionalized nanoencapsulated Curcuma longa essential oil in chitosan nanopolymer and their application for antioxidant and antimicrobial efficacy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 251, 126387.

- [278] **Yeo, S., Jung, S., Cho, H. K., Kim, Y. H., Kim, G. H., Kim, D., ve ark.** (2020). Design and characterization of elastic artificial skin containing adenosine-loaded solid lipid nanoparticles for treating wrinkles. *Pharmaceutics*, 13(1), 33.
- [279] **Keck, C. M., Kovačević, A., Müller, R. H., Savić, S., Vuleta, G. ve Milić, J.** (2014). Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants. *International journal of pharmaceutics*, 474(1-2), 33-41.
- [280] **Sandhu, S. K., Kumar, S., Raut, J., Singh, M., Kaur, S., Sharma, G., ve ark.** (2021). Systematic development and characterization of novel, high drug-loaded, photostable, curcumin solid lipid nanoparticle hydrogel for wound healing. *Antioxidants*, 10(5), 725.
- [281] **Vandita, K., Shashi, B., Santosh, K. G. ve Pal, K. I.** (2012). Enhanced apoptotic effect of curcumin loaded solid lipid nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 9(12), 3411-3421.
- [282] **282. Garg, A., Sharma, G., Goyal, A., Ghosh, G., Si, S. ve Rath, G.** Recent advances in topical carriers of anti-fungal agents. *Heliyon*. 2020; 6 (8): e04663.
- [283] **Xing, R., Mustapha, O., Ali, T., Rehman, M., Zaidi, S., Baseer, A., ve ark.** (2021). Development, characterization, and evaluation of SLN-loaded thermoresponsive hydrogel system of topotecan as biological macromolecule for colorectal delivery. *BioMed Research International*, 2021, 1-14.
- [284] **Uner, B., Ozdemir, S., Yildirim, E., Yaba, A., Tas, C., Uner, M., ve ark.** (2023). Loteprednol loaded nanoformulations for corneal delivery: Ex-vivo permeation study, ocular safety assessment and stability studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 81, 104252.
- [285] **Stahl, M. A., Lüdtke, F. L., Grimaldi, R., Gigante, M. L. ve Ribeiro, A. P. B.** (2024). Characterization and stability of solid lipid nanoparticles produced from different fully hydrogenated oils. *Food Research International*, 176, 113821.
- [286] **Souto, E., Wissing, S., Barbosa, C. ve Müller, R.** (2004). Evaluation of the physical stability of SLN and NLC before and after incorporation into hydrogel formulations. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 58(1), 83-90.
- [287] **Levy, M., Schutze, W., Fuhrer, C. ve Benita, S.** (1994). Characterization of diazepam submicron emulsion interface: role of oleic acid. *Journal of microencapsulation*, 11(1), 79-92.
- [288] **Üner, M., Wissing, S., Yener, G. ve Müller, R.** (2004). Influence of surfactants on the physical stability of solid lipid nanoparticle (SLN) formulations. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 59(4), 331-332.
- [289] **Harde, H., Agrawal, A. K., Katariya, M., Kale, D. ve Jain, S.** (2015). Development of a topical adapalene-solid lipid nanoparticle loaded gel with enhanced efficacy and improved skin tolerability. *RSC advances*, 5(55), 43917-43929.
- [290] **Kumar, S. ve Randhawa, J. K.** (2013). High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 33(4), 1842-1852.
- [291] **Rapalli, V. K., Kaul, V., Waghule, T., Gorantla, S., Sharma, S., Roy, A., ve ark.** (2020). Curcumin loaded nanostructured lipid carriers for enhanced

- skin retained topical delivery: optimization, scale-up, in-vitro characterization and assessment of ex-vivo skin deposition. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 152, 105438.
- [292] **Pinzaru, I., Tanase, A., Enatescu, V., Coricovac, D., Bociort, F., Marcovici, I., ve ark.** (2021). Proniosomal gel for topical delivery of rutin: Preparation, physicochemical characterization and in vitro toxicological profile using 3d reconstructed human epidermis tissue and 2d cells. *Antioxidants*, 10(1), 85.
- [293] **Hayden, P. J., Bachelor, M., Ayehunie, S., Letasiova, S., Kaluzhny, Y., Klausner, M., ve ark.** (2015). Application of MatTek in vitro reconstructed human skin models for safety, efficacy screening, and basic preclinical research. *Applied In Vitro Toxicology*, 1(3), 226-233.
- [294] **Doktorovová, S., Kovačević, A. B., Garcia, M. L. ve Souto, E. B.** (2016). Preclinical safety of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Current evidence from in vitro and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 108, 235-252.
- [295] **Luckanagul, J. A., Ratnatilaka Na Bhuket, P., Muangnoi, C., Rojsitthisak, P., Wang, Q. ve Rojsitthisak, P.** (2021). Self-assembled thermoresponsive nanogel from grafted hyaluronic acid as a biocompatible delivery platform for curcumin with enhanced drug loading and biological activities. *Polymers*, 13(2), 194.
- [296] **Wosicka-Fraćkowiak, H., Cal, K., Stefanowska, J., Glówka, E., Nowacka, M., Struck-Lewicka, W., ve ark.** (2015). Roxithromycin-loaded lipid nanoparticles for follicular targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(2), 807-815.
- [297] **Abla, M. ve Banga, A.** (2014). Formulation of tocopherol nanocarriers and in vitro delivery into human skin. *International journal of cosmetic science*, 36(3), 239-246.
- [298] **Maia, C. S., Mehnert, W. ve Schäfer-Korting, M.** (2000). Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *International journal of pharmaceutics*, 196(2), 165-167.
- [299] **Alqahtani, M. S., Alqahtani, A., Kazi, M., Ahmad, M. Z., Alahmari, A., Alsenaidy, M. A., ve ark.** (2020). Wound-healing potential of curcumin loaded lignin nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102020.
- [300] **Pyo, S. M., Meinke, M., Klein, A. F., Fischer, T. C. ve Müller, R. H.** (2016). A novel concept for the treatment of couperosis based on nanocrystals in combination with solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 510(1), 9-16.
- [301] **Butani, D., Yewale, C. ve Misra, A.** (2016). Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 17-24.
- [302] **Pokharkar, V. B., Mendiratta, C., Kyadarkunte, A. Y., Bhosale, S. H. ve Barhate, G. A.** (2014). Skin delivery aspects of benzoyl peroxide-loaded solid lipid nanoparticles for acne treatment. *Therapeutic delivery*, 5(6), 635-652.
- [303] **Ramzan, M., Kaur, G., Trehan, S., Agrewala, J. N., Michniak-Kohn, B. B., Hussain, A., ve ark.** (2021). Mechanistic evaluations of ketoconazole lipodic nanoparticles for improved efficacy, enhanced topical penetration, cellular uptake (L929 and J774A. 1), and safety assessment: In vitro and in vivo studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 65, 102743.

- [304] **Butani, D., Yewale, C. ve Misra, A.** (2014). Amphotericin B topical microemulsion: formulation, characterization and evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116, 351-358.



## ÖZGEÇMİŞ

**Ad-Soyad** : Beyza Sümeyye AYDIN

**Doğum Tarihi ve Yeri** :

**E-posta** :

## ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

## DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Aydin, B., SAĞIROĞLU, A., & Bahadori, F. A. T. E. M. E. H.** (2023). Optimization and Characterization of Curcumin Microemulsion Formulations with Aromatic Turmerone-rich Extract. *8th World Congress on Nanomedicine, Drug Delivery, and Tissue Engineering*, March 23-25, Lisbon, Portugal (Virtual)
- **Aydin, B. S., Sagioglu, A. A., Ozturk Civelek, D., Gokce, M., & Bahadori, F.** (2024). Development of Curcumin and Turmerone Loaded Solid Lipid Nanoparticle for Topical Delivery: Optimization, Characterization and Skin Irritation Evaluation with 3D Tissue Model. *International Journal of Nanomedicine*, 1951-1966.

## DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Sağiroğlu, A. A., Aydın, B. S., & Demirel, F.** (2024). Enhanced Topical Delivery of Rosehip Oil (RO) through Nanostructured Lipid Carriers (NLC). *HAYDARPAŞA NUMUNE MEDICAL JOURNAL*, 64(1), 97-103.
- **SAĞIROĞLU, A. A., & AYDIN, B. S.** (2024). Development and evaluation of the novel topical formulation containing Bakuchiol for enhanced skin delivery. *Journal of Research in Pharmacy*, 28(2).