VİTAMİN A PALMİTAT YÜKLÜ NANO-DERMAKOZMETİKLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE YARA İYİLEŞTİRME POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Lala BAGHIROVA

Eskişehir 2022

VİTAMİN A PALMİTAT YÜKLÜ NANO-DERMAKOZMETİKLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE YARA İYİLEŞTİRME POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Lala BAGHIROVA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Lala BAGHIROVA'nın 'Vitamin a palmitat yüklü nano-dermokozmetiklerin hazırlanması, karakterizasyonu, yaşlanma karşıtı ve yara iyileştirme potansiyellerinin belirlenmesi' başlıklı tezi 24.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim dalı, Kozmetoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Ünvanı	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez danışmanı)	Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK	
Üye	Doç. Dr. Gülsel Yurttaş KIRIMLIOĞLU	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Umay Merve GÜVEN	

Prof. Dr. Gülşen Akalın Çiftçi

Enstitü Müdürü

ÖZET

VİTAMİN A PALMİTAT YÜKLÜ NANO-DERMAKOZMETİKLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE YARA İYİLEŞTİRME POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Lala BAGHIROVA

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK

Nanoteknolojinin bugünün şartlarında dermakozmetik/kozmetik sektöründe kullanılma şekli, nanometrik boyutlarda üretilen nanopartiküller gibi çok küçük boyutta ürünlerin kozmetik içeriğine aktarılmasıdır. Nano boyuttaki kozmesötik maddelerin kullanılmaya başlanmasının sebebi daha derin cilt emilimi, daha iyi UV koruması, uzun süreli etki ve kararlılık sorunlarını ortadan kaldırmaktır. Bu çalışmada Vitamin A palmitat (VAP) yüklü Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) bazlı ve VAP yüklü kitosan kaplı PLGA bazlı nanopartikül sistemleri nanoçöktürme tekniği ile hazırlanmıştır. Blank formülasyonlar için uygun yöntem ve oranlar bulunduktan sonra parçacık boyutu, parçacık boyut dağılımı (PDI) ve zeta potansiyel verileri değerlendiriliş ve ardından VAP yüklü PLGA ve kitosan kaplı PLGA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan sistemler parçacık boyutu, PDI, zeta potansiyel, VAP miktar tayini için analitik yöntem validasyonu, formülasyonda etkin madde miktar tayini, *in vitro* dissolüsyon çalışması, dissolüsyon kinetiği çalışması gibi parametreler ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonrası optimum formülasyonlar seçilmiştir. Ardından tasarlanan nanopartikül formülasyonlarının HaCaT insan keratinosit deri hücre hatlarında sitotoksisite ve yara iyileştirici profilleri belirlenmiştir. Nanopartikül yapısı ile düşük dozda yüksek yara iyileştirme aktivitesi bulunmuştur. Sonuç olarak dermokozmetik/kozmetik sektöründe kullanılabilecek VAP yüklü nanotaşıyıcılar başarılı bir şekilde üretilmiş ve elde edilen sonuçlar bu sektör için umut verici olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Vitamin A Palmitat, PLGA, Kitosan, Nanopartikül, Nanokozmetik.

ABSTRACT

PREPARATION, CHARACTERISATION AND DETERMINATION OF WOUND HEALING POTENTIALS OF VITAMIN A PALMITATE-LOADED NANO-DERMACOSMETICS

Lala BAGHIROVA

Department of Pharmaceutical Technology

Cosmetology Program

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Assoc. Prof. A. Alper ÖZTÜRK

The way nanotechnology is used in the dermocosmetic/cosmetic industry in today's conditions is to transfer very small products such as nanoparticles produced in nanometric sizes to the cosmetic content. The reason ivort hi use of nano-sized cosmeceuticals is to eliminate the problems of deeper skin absorption, better UV protection, long-term effect and stability. In this study, PLGA-based and VAP-loaded chitosan-coated PLGA-based nanoparticle systems loaded with Vitamin A palmitate (VAP) were prepared by nanoprecipitation technique. After finding suitable methods and ratios for blank formulations, particle size was evaluated according to particle size distribution (PDI) and zeta potential data, and then VAP loaded PLGA and chitosan coated PLGA nanoparticles were prepared. The prepared systems were characterized by parameters such as particle size, PDI, zeta potential, analytical method validation for VAP quantification, active substance quantification in formulation, *in vitro* dissolution study, dissolution kinetic study. Optimum formulations were selected after characterization. Then, the cytotoxicity and wound healing profiles of the designed nanoparticle formulations in HaCaT human keratinocyte skin cell lines were determined. High wound healing activity was found at low ivort with its nanoparticle structure. As a result, VAP loaded nanocarriers that can be used in the dermocosmetic/cosmetic industry have been successfully produced and the results have been evaluated as promising ivort his industry.

Keywords: Vitamin A Palmitate, PLGA, Chitosan, Nanoparticle, Nanocosmetic.

TEŞEKKÜR

Bu tezin ortaya çıkmasında teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara kadar tüm bu süreçlerde bilgi ve tecrübesinden faydalandığım, bana büyük bir anlayış ve sabırla yaklaşan, beni bu süreçte cesaretlendirmesini esirgemeyen ve desteğini her adımda hissettiğim çok değerli danışman hocam Doç. Dr. A. Alper ÖZTÜRK' e çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve elemanlarına, eksik kaldığım yerlerde bilgileri ile beni destekleyen ve çalışmalarımda yardımlarını esirgeyemen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmamızın sitotoksisite ve yara iyileştirici etkilerinin araştırılması için laboratuvarında çalıştığım, bunun için gerekli tüm imkanları sağlayan, yönlendirmeleriyle farklı bakış açıları kazandığım, çalışmamla ilgili yeni teknikler öğreten, disiplinli çalışma ve zamanı verimli kullanmamla ilgili beni yönlendiren, Araş. Gör. Dr. Elif KAYA TİLKİ'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeği büyük olan, benden hayatımın her adımında ilgi ve desteğini esirgemeyen ve maddi manevi her koşulda yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

Lala BAGHIROVA

24.06.2022

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan "bilimsel intihal tespit programı" yla tarandığını ve hiçbir şekilde "intihal içermediğini" beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Lala BAGHIROVA

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI ……. i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ……..... ii
ÖZET ……. iii
ABSTRACT ……..... iv
TEŞEKKÜR ……... v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ …….. vi
İÇİNDEKİLER ……..... vii
TABLOLAR DİZİNİ ……..... xii
ŞEKİLLER DİZİNİ ……..... xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ……... xxiv
1. GİRİŞ VEAMAÇ…….. 1
2. KAYNAK BİLGİSİ ……. 5
2.1. Kozmesötik Maddeler……..... 5
2.1.1. Kozmesötiklerin tarihçesi……... 5
2.1.2. Kozmesötiklerin özellikleri……. 5
2.1.3. Kozmesötiklerin çalışma mekanizması…….. 5
2.1.4. Kozmesötik pazarı……... 6
2.1.5. Kozmesötiklerin ciltteki faydaları…….. 6
2.2. Dermakozmetikler…….. 7
2.2.1. Dermakozmetiklerin amacı…… 7
2.3. Nanokozmetikler……. 7
2.3.1. Nanokozmetiklerin uygulanması ……..... 8
2.3.2. Nanokozmetiklerin avantajları ……. 8
2.4. Polimerik Nanopartiküller…… 9
2.4.1. Nanopartiküllerin tanımı…… 9
2.4.2. Polimerik nanopartiküller nedir? ……..... 10
2.4.3. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler……..... 11
2.4.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması ……..... 12
2.4.4.1. Diyaliz yönetmi…… 13
2.4.4.2. Süper kritik sıvı teknolojisi……. 13
2.4.4.3. Emülsifikasyon- çözücü buharlaştırma yöntemi……..... 14
2.4.4.4. Püskürtme kurutma yöntemi……..... 14

2.4.4.5. Nanoçöktürme yöntemi……... 15
2.4.5. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu……..... 17
2.4.5.1. Parçacık boyutu ve dağılımı……..... 17
2.4.5.2. Zeta potansiyel…… 18
2.4.5.3. *In vitro* dissolüsyon…….. 18
2.4.5.3.1. Membran difüzyon yöntemi…….. 19
2.4.5.3.2. Numune ve ayırma yöntemi…….. 19
2.4.5.3.3. Sürekli akış yöntemi……..... 19
2.4.5.4. Dissolüsyon kinetiği……. 20
2.4.6. Polimerik nanopartiküllerin avantajları……. 20
2.5. PLGA……..... 21
2.5.1. PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması……. 21
2.5.2. PLGA fizikokimyasal özellikleri……... 22
2.6. Kitosan……... 22
2.7. Vitamin A Palmitat…… 23
2.7.1. VAP özellikleri……..... 23
2.7.1.1. UV etkinlik…… 24
2.7.1.2. Antioksidan aktivite …… 24
2.7.1.3. Yaşlanma karşıtı etki…… 25
2.7.1.4. Yara iyileştirme……. 25
3. GEREÇLER…… 28
3.1. Kullanılan Maddeler……. 28
3.2. Kullanılan Cihazlar……... 29
4. YÖNTEM…… 30
4.1. Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları ……... 30
4.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması ……. 30
4.1.1.1. Doğrusallık…….. 30
4.1.1.2. Kesinlik ……..... 31
4.1.1.3. Doğruluk ……. 32
4.1.1.4. Duyarlılık……. 32
4.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması …….. 33

4.1.2.1. Doğrusallık……..... 33
4.1.2.2. Kesinlik…… 34
4.1.2.3. Doğruluk…….. 34
4.1.2.4. Duyarlılık…… 34
4.2. Vitamin A Palmitat Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması…… 34
4.2.1. Blank-NP-1 kodlu formülasyonun hazırlanması…… 36
4.2.2. NP-1 kodlu formülasyonun hazırlanması……... 36
4.2.3. Blank-NP-2 kodlu formülasyonun hazırlanması…… 36
4.2.4. NP-2 kodlu formülasyonun hazırlanması……... 37
4.2.5. Blank-NP-3 kodlu formülasyonun hazırlanması…… 37
4.2.6. NP-3 kodlu formülasyonun hazırlanması……... 37
4.2.7. Blank-NP-4 kodlu formülasyonun hazırlanması…… 38
4.2.8. NP-4 kodlu formülasyonun hazırlanması……... 38
4.2.9. Blank-NP-5 formülasyonun hazırlanması……... 38
4.2.10. NP-5 kodlu formülasyonun hazırlanması……. 39
4.2.11. Blank-NP-6 kodlu formülasyonun hazırlanması…….. 39
4.2.12. NP-6 kodlu formülasyonun hazırlanması……. 39
4.2.13. Blank-NP-7 formülasyonun hazırlanması……. 40
4.2.14. NP-7 kodlu formülasyonun hazırlanması……. 40
4.3. Çalışma Koşulunda Kararlılık……. 40
4.3.1. Formülasyon hazırlama koşulunda kararlılık…… 40
4.3.2. Enkapsülasyon etkinliği tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık…… 41
4.3.3. *In vitro* dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık……... 41
4.4. Vitamin A palmitat yüklü nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu……... 42
4.4.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı…… 42
4.4.2. Zeta potansiyel……... 42
4.4.3. Enkapsülasyon etkinliği…… 42
4.4.4. *In vitro* dissolüsyon…… 43
4.4.5. Dissolüsyon kinetiği……... 43
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları……..... 43

4.5.1. Keratinosit hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması, deneylere hazırlık ve hücre sayımları……... 43
4.5.2. Keratinosit hücrelerinde hücre proliferasyonunu artıran konsantrasyonların belirlenmesi……. 44
4.6. Nanopartiküllerin Yara İyileştirici Etkilerin Belirlenmesi……... 45
4.7. İstatistiksel Analiz……. 45
5. BULGULAR……... 46
5.1. Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları……. 46
5.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması…….. 46
5.1.1.1. Doğrusallık…….. 46
5.1.1.2. Kesinlik ……... 47
5.1.1.3. Doğruluk…….. 50
5.1.1.4. Duyarlılık……. 51
5.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması……... 54
5.1.2.1. Doğrusallık…….. 54
5.1.2.2. Kesinlik…… 53
5.1.2.3. Doğruluk…….. 56
5.1.2.4. Duyarlılık……. 57
5.2. Çalışma Koşulunda Kararlılık……. 58
5.2.1. Formülasyon hazırlama koşulunda kararlılık……. 58
5.2.2. Enkapsülasyon etkinliği tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık…… 58
5.2.3. *In vitro* dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık……... 58
5.3. Vitamin A Palmitat Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu…….. 60
5.3.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı…… 60
5.3.2. Zeta potansiyel……... 69
5.3.3. Enkapsülasyon etkinliği…… 78
5.3.4. *In vitro* dissolüsyon…… 79
5.3.5. Dissolüsyon kinetiği……... 84
5.3.5.1. Sıfırıncı derece kinetik sonuçları…….. 84

5.3.5.2. Birinci derece kinetik sonuçları…… 88
5.3.5.3. Higuchi modeli sonuçları……... 92
5.3.5.4. Korsmeyer-Peppas modeli sonuçları ……... 96
5.3.5.5. Hixson-Crowell modeli sonuçları……..... 101
5.3.5.6. Hopfenberg modeli sonuçları…….. 105
5.3.5.7. Weibull modeli sonuçları……. 110
5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları…… 114
5.4.1. MTT yöntemiyle HaCaT hücrelerinde proliferasyonu artıran konsantrasyonların değerlendirilmesi……..... 114
5.5. Nanopartiküllerin Yara İyileştirici Etkilerin Belirlenmesi……. 124
6. TARTIŞMA…….. 129
6.1. Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları……... 129
6.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması……. 129
6.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması……..... 130
6.2. Çalışma Koşulunda Kararlılık……... 131
6.3. Formülasyonların Hazırlanması…… 131
6.4. Vitamin A Palmitat Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu…… 131
6.4.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı…….. 131
6.4.2. Zeta potansiyel……. 133
6.4.3. Enkapsülasyon etkinliği…….. 134
6.4.4. *In vitro* dissolüsyon……... 134
6.4.5. Dissolüsyon kinetiği……..…… 137
6.5. Hücre Kültürü Çalışmaları…… 140
6.5.1 MTT yöntemiyle HaCaT hücrelerinde proliferasyonu artıran konsantrasyonların değerlendirilmesi…… 140
6.6. Nanopartiküllerin Yara İyileştirici Etkilerin Belirlenmesi……. 141
7. SONUÇ…….. 143
KAYNAKÇA……... 145
EKLER
ÖZGEÇMİŞ

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Piyasadaki ürünler…… **9**

Tablo 2.2. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler……. **12**

Tablo 2.3. Piyasadaki müstahzarlar…….. **27**

Tablo 4.1. Formülasyon içerikleri…… **35**

Tablo 5.1. Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler……..……. **46**

Tablo 5.2. 4 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları……..…. **48**

Tablo 5.3. 6 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları……..……. **49**

Tablo 5.4. 10 µg.mL^{-1} Derişim için Kesinlik Sonuçları…….. **50**

Tablo 5.5. VAP için elde edilen doğruluk değerleri……... **51**

Tablo 5.6. Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler (n=6) ……... **52**

Tablo 5.7. 4 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları……... **54**

Tablo 5.8. 6 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları……... **55**

Tablo 5.9. 10 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları……..... **56**

Tablo 5.10. VAP için elde edilen doğruluk değerleri……..... **57**

Tablo 5.11. Çalışma koşullarında kararlılık sonuçları…… **59**

Tablo 5.12. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı sonuçları…….. **61**

Tablo 5.13. Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel sonuçları……... **70**

Tablo 5.14. Hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği sonuçları…. **78**

Tablo 5.15. Hazırlanan formülasyonların kümülatif dissolüsyon verileri…….. **80**

Tablo 5.16. Sıfırıncı derece kinetik için *in vitro* dissolüsyon kinetiği bulguları….. **84**

Tablo 5.17. Birinci derece kinetik için *in vitro* dissolüsyon kinetiği bulguları…… **88**

Tablo 5.18. Higuchi Modeli için *in vitro* dissolüsyon kinetiği bulguları……..... **92**

Tablo 5.19. Korsmeyer-Peppas modeli için *in vitro* dissolüsyon kinetiği bulguları **97**

Tablo 5.20. Hixson-Crowell modeli için *in vitro* dissolüsyon kinetiği bulguları.. **101**

Tablo 5.21. Hopfenberg modeli için *in vitro* dissolüsyon kinetiği bulguları……. **106**

Tablo 5.22. Weibull modeli için *in vitro* dissolüsyon kinetiği bulguları…… **110**

Tablo 5.23. VAP ve hazırlanan formülasyonların HaCat keratinosit hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin % değerleri…… **115**

Tablo 5.24. VAP, NP-3, NP-6 ve NP-7 konsantrasyonlarının yara iyileştirici etkilerinin ortalama floresans yoğunluğu % değerleri……. **127**

Tablo 5.25. VAP, NP-3, NP-6 ve NP-7 konsantrasyonlarının yara çapı değişimi üzerindeki etkilerinin % değerleri……. **128**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Polimer nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli tekniklerin şematik gösterimi…… **13**

Şekil 2.2. Polimerik nanopartiküllerin nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanması……. **16**

Şekil 2.3. Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan polimerik nanopartiküller……. **16**

Şekil 5.1. VAP'ın 1:1 etanol: aseton ortamında standart eğrisi……. **47**

Şekil 5.2. VAP'ın %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında standart eğrisi……. **53**

Şekil 5.3. Hazırlanan formülasyonların parçacık boyut sonuçları grafiği…….. **62**

Şekil 5.4. Hazırlanan formülasyonların parçacık boyutu dağılımı sonuçları grafiği **62**

Şekil 5.5. Blank-NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu……... **63**

Şekil 5.6. NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…… **63**

Şekil 5.7. Blank-NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu……. **64**

Şekil 5.8. NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…… **64**

Şekil 5.9. Blank-NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu……. **65**

Şekil 5.10. NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut

dağılım raporu…… **65**

Şekil 5.11. Blank-NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu……. **66**

Şekil 5.12. NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…… **66**

Şekil 5.13. Blank-NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu……. **67**

Şekil 5.14. NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…… **67**

Şekil 5.15. Blank-NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…… **68**

Şekil 5.16. NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…….. **68**

Şekil 5.17. Blank-NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…… **69**

Şekil 5.18. NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu…….. **69**

Şekil 5.19. Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel sonuçları grafiği……... **71**

Şekil 5.20. Blank-NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den zeta potansiyel raporu…….. **71**

Şekil 5.21. NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel

raporu…….. **72**

Şekil 5.22. Blank-NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…….. **72**

Şekil 5.23. NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu ……. **73**

Şekil 5.24. Blank-NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu……. **73**

Şekil 5.25. NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…….. **74**

Şekil 5.26. Blank-NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu……. **74**

Şekil 5.27. NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu……... **75**

Şekil 5.28. Blank-NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…….. **75**

Şekil 5.29. NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…….. **76**

Şekil 5.30. Blank-NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…….. **76**

Şekil 5.31. NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…… **77**

Şekil 5.32. Blank-NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…….. **77**

Şekil 5.33. NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu…….. **78**

Şekil 5.34. Hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği sonuçları grafiği **79**

Şekil 5.35. Hazırlanan formülasyonların 72 saatlik kümülatif salım oranları…… **81**

Şekil 5.36. Hazırlanan formülasyonların 24 saatlik kümülatif salım oranları…….. **82**

Şekil 5.37. Hazırlanan formülasyonların 12 saatlik kümülatif salım oranları…….. **83**

Şekil 5.38. NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik) ……. **85**

Şekil 5.39. NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik) …… **85**

Şekil 5.40. NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik) ……... **86**

Şekil 5.41. NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik) …… **86**

Şekil 5.42. NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik) …… **87**

Şekil 5.43. NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik) …….. **87**

Şekil 5.44. NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği

(Sıfırıncı Derece Kinetik) …….. **88**

Şekil 5.45. NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik) …….. **89**

Şekil 5.46. NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik) …….. **89**

Şekil 5.47. NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik) …….. **90**

Şekil 5.48. NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik) …….. **90**

Şekil 5.49. NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik) …….. **91**

Şekil 5.50. NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik) …….. **91**

Şekil 5.51. NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik) ……... **92**

Şekil 5.52. NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli) ……... **93**

Şekil 5.53. NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli) ……. **93**

Şekil 5.54. NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli) …… **94**

Şekil 5.55. NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli) **94**

Şekil 5.56. NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli) **95**

Şekil 5.57. NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli) **95**

Şekil 5.58. NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli) **96**

Şekil 5.59. NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli) **97**

Şekil 5.60. NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli) **98**

Şekil 5.61. NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli) **98**

Şekil 5.62. NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli) **99**

Şekil 5.63. NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli) **99**

Şekil 5.64. NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli) **100**

Şekil 5.65. NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği

(Korsmeyer-Peppas Modeli) …… **100**

Şekil 5.66. NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli) ……... **102**

Şekil 5.67. NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli) …… **102**

Şekil 5.68. NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli) …….. **103**

Şekil 5.69. NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli) ……... **103**

Şekil 5.70. NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli) ……... **104**

Şekil 5.71. NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli) …… **104**

Şekil 5.72. NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli) ……. **105**

Şekil 5.73. NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli) …….. **106**

Şekil 5.74. NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli) ……. **107**

Şekil 5.75. NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli) ……... **107**

Şekil 5.76. NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli) …… **108**

Şekil 5.77. NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)…… **108**

Şekil 5.78. NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)…….. **109**

Şekil 5.79. NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)…….. **109**

Şekil 5.80. NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)…….. **111**

Şekil 5.81. NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)…….. **111**

Şekil 5.82. NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)…… **112**

Şekil 5.83. NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)…… **112**

Şekil 5.84. NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)……. **113**

Şekil 5.85. NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)…….. **113**

Şekil 5.86. NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı *in vitro* dissolüsyon kinetiği

(Weibull Modeli)…… **114**

Şekil 5.87. VAP'ın HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi **116**

Şekil 5.88. NP-1 ve Blank-NP-1 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi……... **117**

Şekil 5.89. NP-2 ve Blank-NP-2 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi……... **118**

Şekil 5.90. NP-3 ve Blank-NP-3 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi……... **119**

Şekil 5.91. NP-4 ve Blank-NP-4 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi…… **120**

Şekil 5.92. NP-5 ve Blank-NP-5 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi……. **121**

Şekil 5.93. NP-6 ve Blank-NP-6 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi…… **122**

Şekil 5.94. NP-7 ve Blank-NP-7 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi…….. **123**

Şekil 5.95. VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, 6 ve 7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki görüntüleri……. **125**

Şekil 5.96. VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki ortalama floresans yoğunluğuna göre çizilen % artış grafiği **126**

Şekil 5.97. VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki görüntüleri…… **127**

Şekil 5.98. VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki yara çapı değişimi üzerine etkileri…… .. **128**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

% EE	: Enkapsülasyon etkinliği
°C	: Derece santigrat
AIC	: Akaike Bilgi Kriteri
CO2	: Karbondioksit
CS	: Kitosan
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EEEMM	: Enkapsüle Edilen Etkin Madde Miktarı
EMA	: Avrupa İlaç ajansı
FBS	: Fetal Bovin Serumu
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FEMTM	: Formülasyondaki Etkin Maddenin Teorik Miktarı
HAT	: Hidrojen Atomu Transferi
HCE-T	: İnsan Kornea Epitel Hücreleri
Hg	: Cıva
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
K / CR	: Kontrollü / Canlı Radikal
LMW	: Düşük Moleküler Ağırlıklı Kitosan
LOD	: Saptama sınırı

LOQ : Miktar tayini sınırı

m : Korelasyon Eşitliğinin Eğimi

MMP : Matriks Metalloproteinaz

MSC : Model Seçme Kriteri

MTT : (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür)

NP : Nanopartikül

PBS : Fosfat Tamponu

Pc : Kritik basınç

PCL : Polikaprolakton

PCS : Foton Korelasyon Spektroskopisi

PDI : Parçacık Boyutu Dağılımı

PEG : Polietilen glikol

PGA : Poliglikolik asit

PH : Potansiyel Hidrojen

PLA : Polilaktik asit

PLA-PEG : Polilaktid- polietilen glikol

PLGA : Poli d,l-laktik-ko-glikolik asit

PNP : Polimerik nanopartikül

r^2 : Determinasyon katsayısı

$r^2_{adjusted}$: Düzeltilmiş korelasyon katsayısı

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SKT : Süper Kritik Akışkan Teknolojisi

SS : y ekseni kesim noktasının standart sapması

Tc : Kritik sıcaklık

TEM : Transmisyon Elektron Mikroskobu

UV : Ultraviyole

UVB : Ultraviyole B

VAP : Vitamin A Palmitat

ZP : Zeta Potansiyel

λ_{maks} : Maksimum Dalga boyu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Cilt görünümü, benlik saygısı ve yaşam kalitesi için çok önemlidir, dolayısıyla cilt bakım ürünleri de büyük bir pazarı temsil eder. Özellikle kozmesötikler, cilt sağlığını ve görünümünü iyileştirmeyi amaçlayan rasyonel olarak tasarlanmış, kozmetik ve farmasötiklerin ara fazında hibrit bir cilt bakımı formülasyonları kategorisini oluşturur. Kozmesötikler, yaşlanmayı geciktirici, kırışık önleyici, saç büyütme, cilt beyazlatma ve yara iyileştirici ajanlar olarak pazarlanmaktadır. Retinoid terimi, retinol ve benzerlerini ve ayrıca A vitamini aktivitesine sahip karotenoidleri ifade eder. Retinoidlerin insan vücudundaki birçok farklı fonksiyonunun yanı sıra cilt üzerinde de çeşitli faydalı etkileri vardır. Topikal retinoidler akne, sedef hastalığı, hiperpigmentasyon, fotoyaşlanmış veya doğal olarak yaşlanmış cilt ve diskrominin tedavisinde etkilidir ve bu nedenle kozmetik ve dermatolojide kullanılır. Bununla birlikte, topikal retinoidlerin yaygın kullanımını sınırlayan iki ana sorun vardır: uygulama yerinde tahriş (kaşıntı veya yanma hissi, eritem, kuruluk, soyulma, ışığa duyarlılık) ve kozmetik ve farmasötik ürünlerdeki kararsızlıklarıdır. Farklı ürün formülasyonlarında A vitamini stabilite verilerinin eksikliği ve son formülasyonlar yoluyla uygun stabilizasyon ihtiyacı giderek yeni formülasyonlara ihtiyacı doğurmaktadır**.**

Nanomalzemeler de bir süredir kozmetikte kullanılmaktadır. Güzellik endüstrisindeki nanoteknolojik ürünleri yüzeysel ve epidermal fayda içindir. Nanoteknolojiyle kozmetiklerin ilk buluşması, esas olarak titanyum dioksit ve çinko oksit gibi UV ışını engelleyicilerinden oluşan güneş koruyucu ürünlerledir. Kozmetikte yararlı nanobiyomateryaller listesine kademeli olarak lipozomlar, nanozomlar, etanozomlar, nanosüngerler, nanokabuklar, nanopartiküller vb. gibi birçok kozmesötik/ilaç dağıtım sistemi eklenmiştir. Kozmetik endüstrisi artık nano ölçekli malzemeleri oldukça rutin bir şekilde kullanmaya başlamıştır. Bu küçük bileşenlerden beklenen faydalardan bazıları daha iyi enkapsülleme, daha iyi dağılabilirlik, gelişmiş performans, gelişmiş doku kalitesi, hassas ve uçucu etkin maddelerin korunması ve daha iyi penetrasyondur. Diğer bir ek avantaj ise, bu ürünlerin aynı anda hem lüks hem elit hem de modaya uygun görünmesidir.

Polimerik nanopartiküller, küçük boyutlarından kaynaklanan özellikleri nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Taşıyıcı olarak polimerik nanopartiküllerin avantajları arasında, kontrollü salım için potansiyel kullanımları, ilacı ve biyolojik aktiviteye sahip diğer molekülleri çevreye karşı koruma yetenekleri, biyoyararlanımlarını

ve terapötik indekslerini iyileştirmeleri yer alır. "Nanopartikül" terimi, morfolojilerine göre farklılık gösteren hem nanokapsülleri hem de nanosferleri kapsar. Nanokapsüller, ilacın içinde genellikle çözündüğü yağlı bir çekirdekten oluşur ve ilacın çekirdekten dissolüsyon profilini kontrol eden polimerik bir kabukla çevrelenir (Membran sistem). Nanoküreler, ilacın içinde tutulabildiği veya yüzeylerine adsorbe edilebildiği sürekli bir polimerik ağa dayanmaktadır (Matriks sistem). Polimerik nanopartiküllerin en başlıca üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir:

Yüksek etkin madde yükleme kapasitesi, yüksek kararlılık ve yüksek raf ömrü, etkin maddenin yapı ve etkinliğini değiştirmemesi, üretim ve karakterizasyonu kolay olması ve üretim maliyeti oldukça düşük olması, düşük dozda etkin madde kullanımı yan etki ve toksik etkinin azalmasına yol açması, hazırlanmalarında biyouyumlu ve biyoparçalanabilir özelliğe sahip polimerler kullanılması ve bu sebeple immünolojik reaksiyona sebep olmaması, proteinler, genetik materyal ve ufak moleküllerin ilgili sistemlere yüklenebilmesi, aktif ve pasif hedeflemeye uygun olması, hidrofobik ve hidrofilik etkin maddelerle uyumlu olması, hedeflendirilebilmeleri, kontrollü ve sürekli salım sağlamalarıdır.

Nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemler ile hazırlanmış bazı ilaçlar Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve klinikte kullanılmaktadır. Polimerik nanopartiküllere yüklenecek ilacın türüne ve bunların belirli bir uygulama yolu için gereksinimlerine bağlı olarak, parçacıkların üretimi için farklı yöntemler kullanılabilir. Genel olarak, önceden oluşturulmuş polimerlerin dispersiyonu veya monomerlerin polimerizasyonu olmak üzere iki ana strateji kullanılır. Önceden oluşturulmuş polimerlerin kullanılmasını gerektiren tekniklerin çoğunda, organik çözücüler genellikle polimeri çözmek için ilk adımda kullanılır. Solvent buharlaştırma, emülsifikasyon / solvent difüzyonu, emülsifikasyon / ters tuzlama, nanoçöktürme gibi yöntemler polimerik nanopartikül hazırlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Nanoçöktürme yöntemi çözücü yer değiştirme yöntemi olarak da adlandırılır ve iki karışabilir çözücü gerektirir. İç faz, aseton veya asetonitril gibi karışabilir bir organik çözücü içinde çözülmüş bir polimerden oluşur. Uygun organik çözücü seçimi ile organik çözücünün buharlaşması ile organik çözücü kolaylıkla uzaklaştırılabilir. Bu tekniğin prensibi, organik çözücünün lipofilik bir çözeltiden sulu fazla yer değiştirmesinden sonra bir polimerin ara yüzey birikimine dayanır. Polimer, ara polariteye sahip suyla karışabilen bir çözücü içinde çözündürülür ve bu çözelti, karıştırılarak (damla damla) veya kontrollü ekleme oranıyla sulu bir

çözeltiye aşamalı olarak eklenir. Polimer çözeltisinin sulu faza hızlı spontane difüzyonu nedeniyle, nanopartiküller su moleküllerinden kaçınması ile anında oluşur. Çözücü nano damlacıklardan yayılırken, polimer nanokapsül veya nanoküre şeklinde çökmeye uğrar. Genel olarak, organik faz sulu faza eklenir, bazı durumlarda tam terside uygulanabilir. Nanopartiküllerin oluşumunu sağlamak için, koloidal süspansiyonun stabilitesini garanti etmek için işleme genellikle yüzey aktif maddeler (YEM) dahil edilebilir. Elde edilen nanopartiküller tipik olarak, iyi tanımlanmış bir boyut ve dar bir boyut dağılımı ile karakterize edilir. Nanoçöktürme tekniği, yüksek tekrarlanabilirliğe sahip basit, tek adımlı bir süreçtir ve Vitamin A palmitat (VAP, Retinil palmitat) gibi hidrofobik ilaçlar için kolaylıkla uygulanabilir ekonomik bir tekniktir.

Polimerik nanopartiküller; lipozomlar ve miseller gibi diğer taşıyıcılardan daha kararlı olma eğilimindedir ve bunların salım özellikleri, polimerin yapısı ve bileşimi değiştirilerek ayarlanabilir. Kitosan ve polikaprolakton gibi çeşitli doğal ve sentetik polimerler araştırılmıştır; bununla birlikte, poli (laktik asit) (PLA) ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), bulunabilirlik, biyouyumluluk nedeniyle en yaygın olarak çalışılanlardır ve PLGA, FDA ve Avrupa İlaç ajansı (EMA) tarafından onaylı polimerdir.

Nanoteknoloji, malzemeleri daha büyük formlarına kıyasla bazı yeni değiştirilmiş özellikler kazandıkları inanılmaz derecede küçük boyutlara dönüştürür. Yeni özellikler zaman zaman tahmin edilebilir olabilir veya kesinlikle eşi görülmemiş ve beklenmedik fiziksel, kimyasal veya biyolojik davranış sergileyebilir. Bu benzersiz özellik, dünya çapındaki farmasötik araştırmacıların ve farmasötik teknologların dikkatini çekmiştir ve şu anda nano boyutlu parçacıklar, emülsiyonlar, süngerler, veziküler dağıtım sistemleri vb. yapmak için kullanmaktadır. Kozmetikler, harici kullanım için tasarlanmış ve düzenlenmiş ürünlerdir. İlaçlardan en büyük farkı, bu maddelerin veya karışımların, cilt, kıllar, tırnaklar, dişler ve ağız boşluğu gibi vücudun dış kısımları için temizlik, güzelleştirme, beslenme, çekiciliği arttırma ve/veya görünümü değiştirme amacıyla formüle edilmiş olmasıdır. VAP bir topikal retinoid örneğidir. Topikal retinoidler akne, sedef hastalığı, hiperpigmentasyon, fotoyaşlanmış veya doğal olarak yaşlanmış cilt ve diskrominin tedavisinde etkilidir ve bu nedenle kozmetik ve dermatolojide kullanılır. Topikal retinoidlerin dezavantajları kozmetik ve farmasötik ürünlerdeki kararsızlıklarıdır ve cilt iritasyonudur. Etkinlik ve aktif maddenin kararlılığını arttırmak için en önemli yaklaşımlardan biri aktif maddeyi polimerik nanopartikül haline getirmektir. Bu kapsamda, bu tezde VAP'ın daha yüksek etki gösteren yeni PLGA bazlı ve kitosan kaplı

PLGA bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi ve kapsamlı *in vitro* deneyler ile etkinliklerinin kendi aralarında saf VAP ile karşılaştırılması planlanmıştır. Tez sonucunda ulaşılmak istenen amaç, piyasada bulunan topikal yan etkileri yüksek, tedavi başarısı düşük ve kozmetik formülasyonlarda kararsız olan VAP'a alternatif olacak ve daha etkili tedavi sağlayabilecek bir kozmetik taşıyıcı sistem geliştirmektir.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Kozmesötik Maddeler

"Kozmesötikler", "Kozmetik" ve "farmasötik" terimlerinin bir birleşimidir (Tsai vd., 2008). ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) "Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası" na göre; ürün, ilaç, kozmetik veya ikisinin bir kombinasyonu olabilir, ancak "yasaya" göre "kozmesötik" teriminin herhangi bir anlamı yoktur. Bu nedenle, "kozmesötik" terimi Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası tarafından tanınmamıştır (Vaishali vd., 2013).

2.1.1. Kozmesötiklerin tarihçesi

Kozmesötik maddeler tıbbi veya ilaç benzeri etkileri olduğu iddia edilen ve kendisinde biyolojik etkin maddeler bulunduran kozmetiklerdir. Kozmesötikler, yararlı topikal etkiler sergileyen ve cilt dejenerasyonunu önleyen bir bileşendir. "Kozmesötik" terimi, 1970'lerin sonunda Dr. Albert M. Kligman tarafından ortaya atılmıştır. Terapötik, hastalık önleyici veya iyileştirici özelliklere sahip kozmetik etkin maddeler içerir ve kişisel bakım ürünleri ile ilaçlar arasında bir köprü görevi gördüğü söylenmiştir (Vaishali vd., 2013).

2.1.2. Kozmesötiklerin özellikleri

Kozmesötikler, sağlıkla ilgili diğer işlevleri veya faydaları sağlayan bileşenler yoluyla güzelliği artırmayı amaçlayan topikal kozmetik-ilaç hibritleridir. Kozmesötiklerin ideal özellikleri etkinlik, güvenlik, formülasyon stabilitesi, yenilik ve patent koruması, ciltte metabolizma ve ucuz üretimdir (Dureja vd., 2005).

2.1.3. Kozmesötiklerin çalışma mekanizması

Kozmesötikler çeşitli mekanizmalarla çalışır. Bunlar keratinositler, fibroblastlar ve melanositler üzerinde etkilidir. Bu bileşikler Japonya'daki hastalar için yarı ilaçtır (quasi-ilaç) ve Japonya, Amerika Birleşik Devletleri'nde reçetesiz ilaçlar, AB kozmetik ürünleri ve aktif farmasötik bileşikler içeren kozmetikler üzerinde düzenleyici kontrol sağlayan tek ülkedir (Tsai vd., 2008).

Kozmetikler gibi, kozmesötikler de topikal olarak kullanılır, ancak farkları, cildin biyolojik işlevlerini etkileyen ve cilt sağlığını geliştirmek için beslenme sağlayan güçlü bileşenler içermeleridir (Brandt vd., 2011).

2.1.4. Kozmesötik pazarı

Kozmetikler giderek daha da popüler hale gelmektedir ve kozmetik satışları cilt bakımı pazarının en hızlı büyüyen bölümlerinden birini temsil etmektedir. Bu ürünler, vitaminler, peptidler, büyüme faktörleri ve bitki özleri dahil olmak üzere birçok formdadır. Topikal vitamin içeren kozmetikler cilt bakımında kullanımı giderek artan ürünler olarak karşımıza çıkmaktadır. (Manela-Azulay vd., 2009).

Cilt anatomisi ve fizyolojisindeki gelişmeler doğrultusunda, kozmesötikler mantıksal olarak geliştirilmiş bir kavramdır. Modern inanç, cilde uygulanan neredeyse tüm bileşiklerin cilt yapısına nüfuz etme ve onu değiştirme yeteneğine sahip olmasıdır (Manela-Azulay vd., 2009).

Kozmesötik ürünlerde sağlanan ilaçlarla ilgili olarak hala birçok tartışmalı görüş vardır; bunlar arasında etki mekanizması, optimum konsantrasyon, biyoaktif form, formülasyon stabilitesi, geçirgenlik ve ciltte tutulma yer almaktadır (Manela-Azulay vd., 2009).

2.1.5. Kozmesötiklerin ciltteki faydaları

Kozmesötikler, cilt bakımı pazarının en hızlı büyüyen bölümüdür ve fotoyaşlanma, pigmentasyon ve kırışıklıklar gibi durumlar için çeşitli topikal kozmesötik tedaviler yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha fazla araştırma gerekmesine rağmen, tamamlayıcı kozmesötik tedaviler, yara iyileşmesi sırasında cilt kanseri, fotoyaşlanma ve cilt yenilenmesini önlemeye yardımcı olabilmektedir (Tsai vd., 2008).

Dermatolojik uygulamalarda, kozmesötikler, fotoyaşlanma tedavisi için tanınan bir araç haline gelmesine rağmen, yara iyileşmesindeki genel uygulaması tam olarak çalışılmamıştır. Yara iyileşmesi karmaşık bir süreçtir ve deri bütünlüğünün bozulması sonrası ülser, açılma, hipertrofik skarlar ve keloidler gibi birçok yan etkiye neden olmaktadır. Ek olarak, ameliyat sonrası yara iyileşmesi nadiren kötü estetik etkilere ve fonksiyonel deformitelere yol açarak hastalarda ciddi fiziksel veya psikolojik sıkıntılara neden olabilmektedir. Çeşitli kozmetiklerin anti-inflamatuar ve cilt yüzeyi onarım etkileri, yara iyileşme sürecinin estetik etkisini potansiyel olarak artırabilmekte ve böylece geleneksel yara iyileştirme yönetimi için daha fazla fayda sağlayabilmektedir (Tsai vd., 2008).

2.2. Dermakozmetikler

Kozmetikler, doğrudan cilde uygulanarak kişisel görünümü iyileştirmeyi amaçlayan pudra veya krem gibi müstahzarlar olarak kabul edilmektedir. Bilim ve teknolojide zamanla olan gelişmeler, normal cildin fizyolojisine ve kozmetiklerin fiziksel modifikasyon ve biyolojik aktivite yoluyla görünümünü nasıl değiştirdiğine dair anlayışı değiştirmiştir. Dermakozmetik çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde kozmetik kullanan bir kozmetoloji ve dermatoloji dalıdır (Dreno vd., 2014).

2.2.1. Dermakozmetiklerin amacı

Dermakozmetikler tek başına veya ilaca ilave olarak genelde UV koruyucu, kuru veya yaşlanan cilt, akne, rozasea, atopik dermatit, sedef hastalığı ve seboreik dermatit gibi inflamatuar cilt hastalıklarının ve farklı saç ve tırnak hastalıklarının tedavi edilmesinde kullanılmaktadır (Dreno vd., 2014).

Dermakozmetik maddeler monoterapi olarak veya tıbbi tedaviler ile kullanılabilmektedir. Genel olarak kullanılan bazı dermokozmetik maddelere örnek olarak topikal antioksidanlar, salisilik asit, lipo-hidroksi asit, alfa-hidroksi asitler, retinol bazlı maddeler ve linoleik asit verilebilir (Araviiskaia ve Dréno, 2016).

2.3. Nanokozmetikler

Nanoteknoloji ile oluşturulan nanoürünler, kozmetik teknolojisindeki en büyük gelişmeler arasında yer almaktadır ve kozmetik biliminin daha da ilerlemesini ve yaygınlaşmasını sağlamıştır. Nanomalzemeler sağlık alanında ilgi görmeye başladıkları için kozmetik pazarı, ürünlerine nanopartikülleri dahil eden en gelişmiş endüstri olarak kabul edilmektedir (Ajazzuddin vd., 2015).

Nano boyutta olan malzemeler, etkinliği geliştirmek ve çeşitli kozmetiklerin verdiği hücresel tepkileri etkileme potansiyeline sahiptir. Kullanılan nanopartiküllerin türüne bağlı olarak, görülen etkiler değişebilmektedir (Banerjee, 2017).

Kozmetikte, nanoteknoloji bazlı ürünler "Nanokozmetik" olarak adlandırılmaktadır. Nanokozmetikler geleneksel kozmetiklerle karşılaştırıldığında yüzey yapıları, küçük boyutta olmaları ve benzersiz özellikleri nedeniyle ileri bir performansa sahiptir. Nanokozmetikler aerosoller, süspansiyonlar gibi çok talep edilen partikül formlarında bulunma kapasitesine sahiptir ve etkinlikleri bu partikül formlarının sayesinde artmaktadır (Jeswani vd., 2019).

2.3.1. Nanokozmetiklerin uygulanması

Nanopartiküllerin kozmetikte yaygın olarak uygulanması ile kozmetiklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini iyileştirme, görsel olarak çekici olma, etkin maddelerin stabilitesini arttırma, etkin maddelerin penetrasyonunu ayarlama ve penetrasyon yolunu değiştirme gibi özellikler elde edilebilmektedir (Banerjee, 2017).

Nanotaşıyıcıların küçük boyutu, etkin maddelerin cilt penetrasyonunu ve hücre içine alımını etkilemektedir. Boyut, nanopartiküllerin cilt üzerindeki etkisinin önemli bir belirleyicisidir. Nanopartiküllerin kozmetik etkisini etkileyen bir diğer önemli parametre ise çözünme ve parçalanma özellikleridir (Banerjee, 2017).

Kozmetikte nano malzemelerin yaygın şekilde kullanımının sebebi, bu nanoparçacıkların büyük ölçekli parçacıklardan farklı yenileme özelliklerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Bu değişen özellikler arasında renk, şeffaflık, çözünürlük ve kimyasal reaktivite bulunur ve nanomalzemeleri kozmetik ve kişisel bakım endüstrileri için çekici kılmaktadır (Raj vd., 2012).

2.3.2. Nanokozmetiklerin avantajları

Nanokozmetiklerin birçok avantajları bulunmaktadır. İçeriğinde bulunan etkin maddenin dissolüsyonunu kontrol ederek etkin maddenin kontrollü salımını gerçekleştirirler ve kokuların uzun süre kalmasını sağlarlar. Nanokozmetikler cilt bakım formüllerini daha etkili hale getirirler, UV korumayı iyileştirerek güneşten koruyucu etkinliği arttırırlar. Partikül boyutlarının çok küçük olması nedeniyle yüzey alan artar ve bu da aktif bileşenlerin cilde aktif olarak taşınmasını sağlar (Kaul vd., 2018). Nanotaşıyıcı içeren bazı ürünler Tablo 2.1.'de sunulmuştur.

Tablo 2.1. *Piyasadaki ürünler (ÖZTÜRK, 2018).*

Marka	Preparat İsmi	Nanosistem
Christian Dior	Capture	Lipozom
Nichiyu Liposome	Coatsome NC	Lipozom
Estée Lauder Advanced	Night Repair Protective Recovery Complex Royal Jelly Lift	Lipozom
Jafra Cosmetics	Concentrate	Lipozom
Lancôme	Niosome Plus Daily Treatment	Niozom
Lancôme	Primordiale	Nanokapsül
Vitacos Company	NanoVital Vitanics Whitening Cream	Nanoemülsiyon
Estée Lauder	Renutriv range, Resilience Range	Novazom
Isabelle Lancray	Surmer Crème Legère Nano-Protection	Katı lipit nanopartikül

2.4. Polimerik Nanopartiküller

2.4.1. Nanopartiküllerin tanımı

Süspansiyon, emülsiyon ve çözelti gibi ilaç taşıyıcı sistemlerinde yüksek dozda etkin madde içermesi yüksek yan etki oluşturabilmekte ve bu formülasyonlar bazı durumlarda düşük farmokolojik etkiye sahip olmaktadır. Bu sebeple süspansiyon, emülsiyon ve çözelti geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin çoğu durumda kullanımları sınırlı hale gelmektedir. Bu sistemlerde öngörülemeyen düzeyde kan profilinde etkin madde dalgalanmalarının ortaya çıkması ve bu dalgalanmaların plazma derişimini değiştirip sabitlenememesinden dolayı yeni ilaç taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmuştur (Mudshinge vd., 2011).

Nanopartikül sistemler, nanoteknolojinin bir gelişmesidir ve terapötik maddelerin organlara, spesifik hücrelere veya dokulara güvenli bir şekilde verilmesi için potansiyel adaylardır (Parveen ve Sahoo, 2008).

Nanopartiküller ölçüleri 10-1000 nm arasında değişen, mikron altı, biyolojik olarak parçalanabilen veya parçalanamayan, katı ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Reis vd., 2006).

Nanopartiküller ilaçların belirli organ ve hücrelerde tutulması ve salımı ile alakalı sorunları büyük ölçüde azaltabilen sistemlerdir. Nanopartikül sistemlerinde, sisteme dahil edilen etkin madde partikül içinde çözünmüş veya dağılmış, aynı zamanda partikül yüzeyine tutunmuş veya kovalent olarak bağlanmış olabilir (Parveen ve Sahoo, 2008).

Etkin maddenin polimer membranla çevrelendiği sistem nanokapsül olarak adlandırılmıştır. Polimer içinde ilacın eşit dağıtıldığı sisteme ise nanoküre adı verilmiştir (Crucho vd., 2017).

In vivo kullanmak için hazırlanmış ilaç içeren nanopartiküllerin tasarımında belli sayıda polimer mevcuttur. Bu polimerlerin bazı özellikleri taşıması gerekmektedir. Bu özelliklerden ilki polimerin biyobozunur olması veya kısa zaman içinde vücüttan tamamen atılmasıdır. Diğer özellik ise toksisite oluşturmaması ve immunojenik olmamalarıdır (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

2.4.2. Polimerik nanopartiküller nedir?

Polimerik nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında değişen katı kolloidal parçacıklardır. *In vivo* uygulamalar için orta büyüklükteki (20-100 nm) polimerik nanopartiküller, kanı uzun sürede geçme yeteneğine sahip olduğu için büyük ölçüde avantaj sağlarlar (Crucho, 2015). Polimerik nanopartiküller , çok yönü özelliklere sahip ilaç dağıtım sistemleridir (Zhong vd., 2014). Vücutta toksik olmayan parçalanma ürünlerine dönüşen polimerler ile hazırlanan polimerik sistemler, ilaçların uzatılmış etki ve kontrollü salım sağlamalarından dolayı dünya genelinde üzerinde durulan sistemlerdir. Sahip olduğu üstünlükler sebebiyle ilaç etkin maddesinin polimer içine yüklenmesi sonucu kontrollü ve uzatılmış salım sağlarlar (Akagi vd., 2011). Polimer bazlı ilaç dağıtım sistemleri yüzey modifikasyon ve kapsülleme yeteneği nedeniyle avantaj sağlarlar ve aynı zamanda az bir dozda yüksek etki sağlayabilirler. Hedeflendirilebilir özellikleri ile ilaç ihtiyacı olmayan yerlerde ilaca maruz kalmayı en aza indirirler (Colson vd., 2012). İlaç kapsülleme yöntemleri ya da polimerik enkapsülasyon aşağıda verilen nedenlerden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır:

- Olumsuz organoleptik özelliklerin maskelenmesi (tat, renk, koku),
- İlaç salımının uzatılması,
- Bazı hassas ilaçların sindirim sisteminin özelliklerinden etkilenmesi,
- İlaç moleküllerini çevresel faktörler olan ısı, nem, oksijen ve ışıktan korunması,
- Yeni dozaj formlarının tasarlanması,
- Uçucu maddelerin buharlaşmasının önlenmesi (Rivas, 2017).

2.4.3. Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler

Nanopartikül hazırlanmasında doğal ve sentetik birçok polimer kullanılmaktadır. Nanopartikül hazırlanmasında en sık kullanılan vücutta biyoparçalanır polimerlere örnek olarak Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) ya da bunların kopolimeri olan Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) verilebilir. PLA, PGA ve PLGA gibi diğer biyobozunur ve biyouyumlu polimerler nanopartikül sistemlerin hazırlanmasında kullanılabilmektedir (Cohen-Sela vd., 2009). Nanopartikül hazırlamada kullanılan bazı polimerler Tablo 2.2.'de sunulmuştur.

Tablo 2.2. *Nanopartikül hazırlamada kullanılan polimerler (Cohen-Sela vd., 2009).*

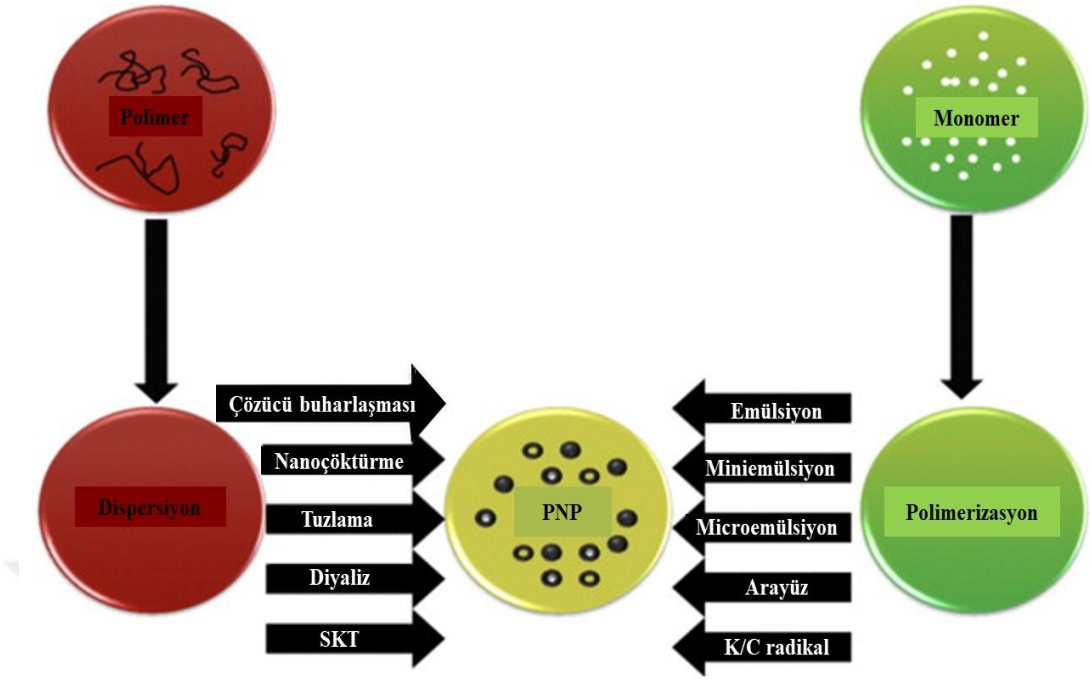
Polimer Tipleri	**Polimerlerin İsimleri**

Sentetik polimerler	Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Poli (laktik asit) (PLA) Poli (glikolik asit) (PGA) Poli (etilen glikol) (PEG) Eudragit
Doğal Polimerler	Kitosan Jelatin Albumin Hiyalüronik asit Aljinat
Blok Kopolimerler	Poli (laktik asit)- poli (etilen glikol) (PLA-PEG)

2.4.4. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler iki gruba ayrılmaktadır. İlk grup monomerlerin polimerizasyonu, ikinci grup ise polimerlerin dispersiyonudur (Crucho vd., 2017). Monomerlerin polimerizasyonunda; emülsiyon polimerizasyonu, miniemülsiyon polimerizasyonu, mikroemülsiyon polimerizasyonu, yüzeylerarası polimerizasyon, kontrollü radikal polimerizasyonu gibi yöntemler mevcuttur. Polimerlerin dispersiyonunda ise çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme, tuzla çöktürme, diyaliz, süperkritik sıvı teknolojisi ve püskürterek kurutma gibi mekanik yöntemler bulunmaktadır. (Rao vd., 2011).

Polimer bazlı nanopartikül hazırlarken önemli olan noktalardan biri partikülün boyut ve şeklidir. Monomerlerin veya polimer birimlerinin sayısı arttıkça nanoparçacık veya kapsülün boyutu da artmaktadır (Amgoth vd., 2019). Polimer nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli tekniklerin şematik gösterimi Şekil 2.1.'de sunulmuştur.



Şekil 2.1. *Polimer nanopartiküllerin hazırlanması için çeşitli tekniklerin şematik gösterimi. SKT: süper kritik akışkan teknolojisi, K / CR: kontrollü / canlı radikal (Rao vd., 2011).*

2.4.4.1. *Diyaliz yöntemi*

Diyaliz yöntemi partikül boyutu çok küçük olan polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında iyi bir performans göstermektedir. Bu yöntemde, nanoçöktürme yöntemine benzer bir teknik ile nanopartiküller elde edilmektedir. Polimer bariyeri olarak diyaliz tüpleri ya da membranlar kullanılmaktadır. Diyaliz yönteminin mekanizması, kullanılan polimer organik bir çözücü içinde çözündürüldükten sonra diyaliz tüplerine doldurularak çözücü olmayan maddeye karşı diyaliz edilmesi şeklinde açıklanabilmektedir. Bu yöntem ile nanopartikül hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken nokta çözücülerin karışabilmesi ve seyreltik polimer çözeltilerinin oluşması olarak belirtilmiştir (Crucho vd., 2017).

2.4.4.2. *Süper kritik sıvı teknolojisi*

Nanopartikül hazırlanmasında organik çözücülerin ve yüzey aktif maddelerin kullanıldığı yöntemler çevreye vermektedir. Hazırlanan sistem içinde kalıntı çözücü safsızlığı bulunduğunda, sistem toksik etki gösterebilmekte veya içeriğinde bulunan etkin maddenin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu dezavantajların üstesinden gelebilmek için çevre için minimum zararı olan yöntem araştırmaları yapılmıştır. Süper kritik sıvı

teknolojisi çevreye yararlı olması, basit ve tekrarlanabilir boyut büyütme, homojenliğin kontrol altına alınabilmesi gibi özellikleriyle alternatif yöntem olarak kullanılmaktadır (Crucho vd., 2017).

Süper kritik sıvı, kritik sıcaklık ve kritik basıncın üzerinde ısıtılarak sıkıştırılmış bir sıvıdır. En fazla ve yaygın olarak kullanılan süper kritik sıvı karbon dioksittir. Karbon dioksit ucuzluğu, kolay bulunabilir olması, kritik koşullarının az olması, yanıcılığının olmaması, toksik etkilerinin olmaması ve çevre dostu olması sebebiyle geniş kullanım imkanları sunmaktadır (Crucho vd., 2017)

Süper kritik sıvı teknolojisinin nanopartiküllerin hazırlanmasında çok yaygın olarak kullanılmamasının en başlıca sebeplerinden biri yüksek maliyetli ekipman gereksiniminin olmasıdır. Diğer bir dezavantaj ise polimerlerin süper kritik sıvıda çözünürlüğünün çok düşük olması veya hiç çözünmemesidir (Crucho vd., 2017).

2.4.4.3. *Emülsifikasyon- çözücü buharlaştırma yöntemi*

Bu yöntemde uçucu çözücülerde hazırlanan polimerler emülsiyon oluşturmak için formüle edilir. Geçmişte yaygın olarak diklorometan ve kloroform çözücüleri kullanılmıştır. Daha sonra bu çözücüler etil asetatla yer değiştirmiştir.

Emülsiyonun bir nanoparçacık süspansiyonuna dönüştürülmesi, emülsiyonun sürekli fazı boyunca yayılmasına izin verilen polimer çözücünün buharlaşmasıyla gerçekleşir. Bu proses vakum altında yapılan ve uzun süre devam eden bir işlemdir.

Bu yöntemde kararlılığı sağlamak için pluronik F68, polimer olarak ise PLA, PCL ve PLGA kullanılmaktadır ve yüzey etkin madde kullanılmasına gerek yoktur (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

2.4.4.4. *Püskürtme kurutma yöntemi*

Püskürtme kurutma tekniğinin amacı sıvı haldeki besleme karışımının katı hale geçiş yapmasıdır. Yöntemde öncelikle ilaç, polimer ve sürfaktan ile beraber çözündürülür ardından elde edilen çözelti farklı sıcaklıklarda püskürterek kurutma cihazı ile püskürtülerek kurutma sağlanır (Mahalingam ve Krishnamoorthy, 2015).

Genellikle bir parçacık bir damlacıktan ibarettir. Eğer damlacıkların merkezindeki çözünen madde miktarı denge doygunluğundan daha az ise, bu zaman damlacıkların yüzey kısmındaki çöken polimerler partikül oluşturur. Yöntemin ekonomik ve tekrarlanabilir olması yaygın şekilde kullanmasını sağlamaktadır(Nasir vd., 2015).

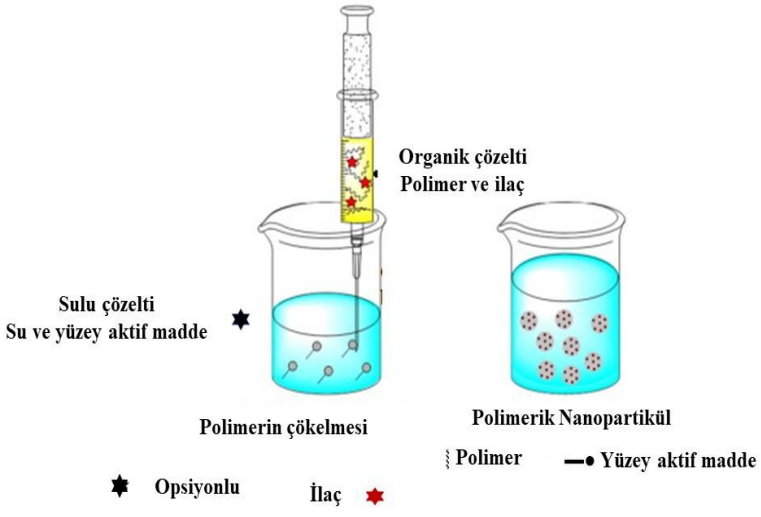
2.4.4.5. *Nanoçöktürme yöntemi*

Nanoçöktürme yöntemi Fessi ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, çözücü yer değişim yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan en basit yöntemdir. Nanoçöktürme yöntemi tekrarlanabilen, hızlı ve ekonomik olan bir yöntemdir (Vauthier ve Bouchemal, 2009).

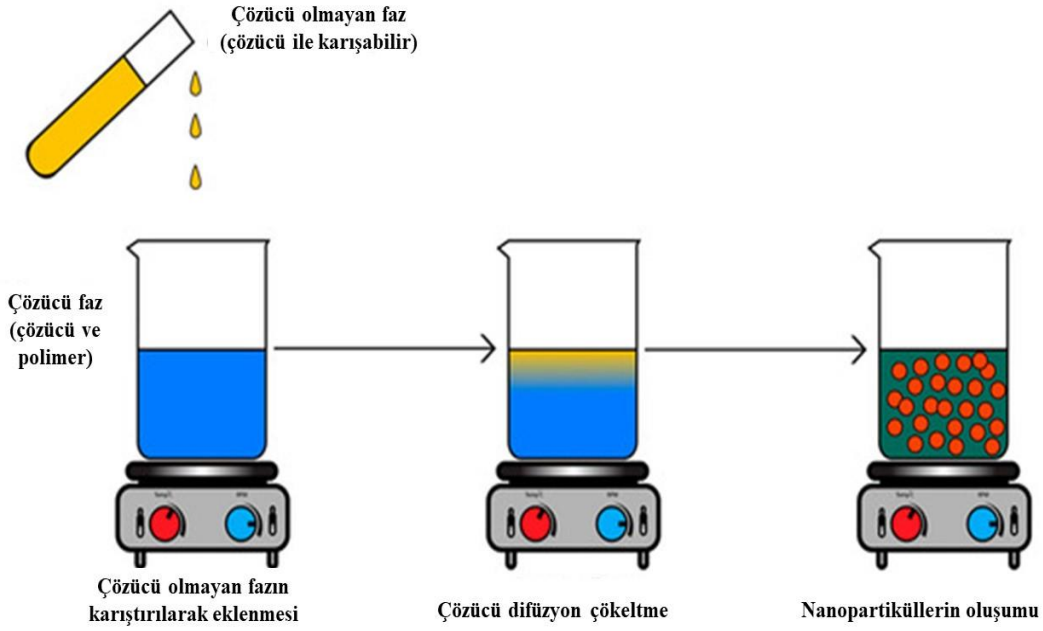
Nanoçöktürme, nanopartiküllerin ana bileşenlerini çözen çözücünün kalitesini düşürmeye dayanır. Çözücü kalitesindeki bu değişiklik, pH değeri, tuz konsantrasyonu, çözünürlük koşulları değiştirilerek veya solvent olmayan maddeler eklenerek elde edilebilir.

Çözücünün kalitesini düşürme yöntemine göre nanoçöktürme, çözücüsüz çökeltme, desolvasyon, pıhtılaşma, tuzlama ve albümin bazlı teknoloji gibi farklı alt yöntemlere ayrılabilir (Tarhini vd., 2018).

Nanoçöktürme yöntemiyle nanopartikül hazırlarken etken madde ve polimer organik çözücü içinde çözündürülür, daha sonra içerisinde yüzey etkin madde içeren sulu çözeltiye eklenir. Organik çözücü uygun sıcaklıkta uzaklaştırıldıktan sonra geride polimerle kaplanmış nanopartiküller kalır (Makadia vd., 2011). Polimerik nanopartiküllerin nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanması şematik olarak Şekil 2.2.'ve Şekil 2.3.'te sunulmuştur.



Şekil 2.2. *Polimerik Nanopartiküllerin Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanması (Crucho vd., 2017)*



Şekil 2.3. *Nanoçöktürme yöntemiyle hazırlanan polimerik nanopartiküller (Tarhini vd., 2018)*

Bu yöntemde çözücü, suyla karışan ve buharlaştırıldığında kolayca uzaklaşan çözücüler arasından seçilir. Bu nedenle genellikle aseton kullanılır. Bazen ikili çözücü karışımları kullanılmaktadır (Thioune vd., 1997). Etanol ve aseton karışımları bu ikili çözücü karışımlarına örnek olarak verilebilir ve başarılı bir şekilde kullanılabilmektedir (Murakami vd., 1999).

Bu yöntemde nanopartikülü hazırlamadan önce etkin maddenin polimere veya nanopartikül yüzeyine kovalent olarak bağlanması, etkin maddenin polimerik taşıyıcı sistem üzerine adsorpsiyonu veya nanopartikülleri hazırlarken etkin maddeyi polimer matris içinde hapsedilmesi gibi farklı çalışma ve hazırlama stratejileri kullanılmaktadır (Jung vd., 2000).

Nanoçöktürme yönteminin avantajları aşağıda sıralanmıştır.

- Su ile kolay karışabilen çözücülerin kullanımı ile toksik reaksiyonlar azalmaktadır.
- Damla damla parçacıkların oluşması hidrofobik ilaçların kapsüllenmesi için tek adımlı basit yöntemdir ve partikül boyutu dar dağılımda elde edilmektedir.

- Ekonomik ve hızlı bir yöntemdir.
- Ölçek büyütme kolaydır.
- Daha düşük santrifüj hızı, partikülleri yüksek verimle toplamak için yeterlidir (Almoustafa vd., 2017).

2.4.5. Polimerik nanopartiküllerin karakterizasyonu

2.4.5.1. *Parçacık boyutu ve dağılımı*

Nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerini doğrulamak için çok sayıda karakterizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Parçacık boyutu ve dağılımı, nanopartiküllerin *in vivo* davranışını, toksisitesini, ilaç salımını ve kararlılığını belirlemek için önemli bir analiz yöntemidir. Yapılan çalışmalarda mikron-altı boyutundaki nanopartiküllerin mikron boyutuna sahip ilaç dağıtım sistemleriyle kıyaslandığında sahip olduğu avantajlar belirlenmiştir. Mikron-altı boyutundaki nanopartiküllerin hücre içine girme oranı ve hareketlilikleri mikron boyutundaki sistemlere nazaran daha yüksektir (Maruthi, vd., 2011).

Parçacık boyutu ilacın dissolüsyonunu ve polimer degradasyonunu etkileyen özellikler arasında ilk başlarda yer almaktadır. Küçük boyuta sahip partiküller geniş yüzey alanına sahip olduklarından dolayı ilaç ya partikül yüzeyinde ya da enkapsüle halde bulunur. Bu durum ilacın daha kolay bir şekilde dissolüsyonunu sağlar. Daha büyük boyutta olan parçacıklarda ise ilaç geniş boşluklara dolar ve bu sebeple ilaç dissolüsyonu daha geç olur. Küçük boyuttaki parçacıkların en büyük sorunu ise agregasyon oluşturmalarıdır. Polimer degradasyonunu parçacık boyutundan da etkilenebilmektedir (Maruthi vd., 2011).

Nanopartiküllerin parçacık boyutu ve dağılımını belirlemek için foton korelasyon spektroskopisi (PCS) veya dinamik ışık saçılımı (DLS), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Khater vd., 2021).

2.4.5.2. *Zeta potansiyel*

Nanopartiküllerin elektriksel özellikleri zeta potansiyel ölçümleri ile belirlenmektedir. Yüksek zeta potansiyellerde elektriksel itmelerden dolayı yüklü parçacıklarda agregasyonun meydana gelme olasılığı daha düşüktür (Khater vd., 2021). Maddelerin zeta potansiyel değeri ‘zeta sizer’ adlı cihaz ile ölçülür (Tantra vd., 2010).

Nanopartiküllerin kararlılık göstergesi olan zeta potansiyel değerinin +30 mV'den daha yüksek ve -30 mV'den daha düşük değerde olması ideal olarak belirtilmiştir (Khater vd., 2021).

2.4.5.3. *In vitro dissolüsyon*

Nanopartiküllerin başarılı formülasyonlar olarak elde edildiğinin önemli bir göstergesi içlerinde bulunan ilacın salımını veya dissolüsyonunu başarılı ve istenilen şekilde yapabilmesidir. Nanopartiküllerden ilacın dissolüsyonu aşağıda verilen parametrelere göre değişiklik gösterebilmektedir:

1) Polimer duvarından difüzyon
2) Adsorbe edilmiş ilacın desorpsiyonu
3) Nanopartikül yoluyla difüzyon
4) Nanopartikül matris erozyonu
5) Erozyon/difüzyon süreci

Sonuç olarak biyolojik olarak bozunma ve difüzyon, ilacın dissolüsyon süresini belirlemektedir. *In vitro* dissolüsyon testinin birbirinden farklı formülasyonların yeteneğini karşılaştırma özelliğinden dolayı ilaç gelişiminde önemli bir rolü vardır (Heng vd., 2008). *In vitro* dissolüsyon testlerini geliştirmek için birçok yöntem denenmiş ve bulunmuştur. Bu yöntemler başlıca üç gruba ayrılmaktadır:

1. Membran difüzyon yöntemi
2. Numune ve ayırma yöntemi
3. Sürekli akış yöntemi (Soppimath vd., 2001).

2.4.5.3.1. *Membran difüzyon yöntemi*

Membran difüzyon yöntemi dissolüsyon çalışmalarında en yaygın kullanılan yöntem olarak bilinmektedir. Yönteminin başlıca özelliği nanopartikül sistemlerden salınan serbest ilacı geçiren, nanopartikülü geçirmeyen diyaliz membranının kullanılmasıdır. Membran difüzyon yöntemi ya da diyaliz yöntemi kendi içinde üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; diyaliz kesesi yöntemi, ters diyaliz kesesi yöntemi ve yan yana diyaliz yöntemidir. Diyaliz kesesi yöntemi, nanopartikül sistemleri bir diyaliz kesesinin

içine yerleştirilir, ortama bırakılır ve sıcak su banyosunda karıştırılarak gerekli analizler yapılması şeklinde tasarlanmaktadır (Shen ve Burgess, 2013).

2.4.5.3.2. Numune ve ayırma yöntemi

Bu yöntemde doğrudan dissolüsyon ortamına eklenen nanopartikül sistemleri ilgili dissolüsyon ortamında dağıtılmaktadır ve nanopartikülleri serbest salınan ilaçtan ayırmak için farklı zaman aralıklarında ultrafiltrasyon, ultrasantrifüjleme ve santrifüj ultrafiltrasyon gibi numune ayırma yöntemleri kullanılmaktadır. Yöntemin dezavantajı nanopartikülleri ortamdan ayırmanın zor olması ve yüksek basınç altında ultrasantrifüjleme ile nanopartiküllerin stabilitesinin bozulması sayılabilir (Shen ve Burgess, 2013).

2.4.5.3.3. *Sürekli akış yöntemi*

Sürekli akış yöntemi (USP Aparat 4) değiştirilmiş salım yapan oral dozaj formları için geliştirilmiştir. USP Aparat 4 yöntemi, hareketsizleştirilmiş formülasyonlar yoluyla ortamın küçük bir hacmini sürekli olarak dolaştırabildiğinden, parenteral dozaj formları için *in vivo* ortamı (örn., deri altı dokusu) simüle etmede avantajlar gösterir. Ek olarak, USP Aparat 4 ile kullanılan ortam hacmi, çeşitli formülasyonların test edilmesine izin verecek şekilde ayarlanabilir ve bu, birçok düşük doz parenteral formülasyon için özellikle önemlidir. USP Aparat 4'ün bir uyarlaması, mikroküreler gibi parenteral sürekli dağıtım sistemlerinden ilaç salımını araştırmak için geliştirilmiştir. Bu yöntem mikrokürelerden ilaç salımını araştırmak için yaygın olarak kullanılmıştır (Shen ve Burgess, 2013).

2.4.5.4. *Dissolüsyon kinetiği*

Test yönteminden bağımsız olarak, salım kinetiği çalışmalarının altında yatan varsayım, nanopartikül sistemlerin doz aralığının ve salım ortamının hacminin batma koşullarını (ortamın hacmi olarak doymuş bir çözelti oluşturmak için gerekenin en az üç katı olarak tanımlanır) karşılamasıdır. Yani, ilaç salımı çözünürlükle sınırlı değildir ve salma kinetiği profilindeki fark, *in vivo* olarak bir ilaç taşıyıcısı olarak nanopartiküllerin performansını yansıtır. Bu gereksinimi karşılamak için, nanopartiküller için yeterli miktarda salım ortamının kullanılması önemlidir. Bununla birlikte, suda az çözünür ilaçlar söz konusu olduğunda, nanopartikül kütlesinin salım ortamının hacmine çok düşük

bir oranı anlamına geldiğinden, çökelme koşulunu yerine getirmek oldukça zor olabilir. Büyük hacimli salım ortamı kullanmanın bir dezavantajı, düşük konsantrasyon nedeniyle ilaç analizinin zorlaşmasıdır. Bu zorluğu azaltmak için, örneklenen çözelti analizden önce konsantre edilir veya ilaç çözünürlüğünü (dolayısıyla nanopartikül kütlesinin orta hacme oranı) arttırmak için salım ortamına yüzey aktif maddeler veya yardımcı çözücüler gibi bir çözünme yardımcısı eklenir (Abouelmagd vd., 2015).

2.4.6. Polimerik nanopartiküllerin avantajları

Polimerik nanopartiküllerin avantajları aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

- Küçük partikül boyutuna sahiptirler (Panyam vd., 2003).
- Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında biyolojik olarak parçalanabilen malzemelerin kullanılmaktadır. Birkaç gün veya hatta haftalar içinde, biyolojik olarak parçalanabilen materyal, hedef doku üzerinde kontrol edilebilir bir etkiye sahip olmaktadır ve ilaçlar / proteinler veya peptitlerin stabilitesini arttırmaktadır (Soppimath vd., 2001).
- Oral yolla ilaç uygulandığı zaman, nanopartikül şeklinde verilen ilacın dissolüsyon ve biyoyararlanımı artmaktadır.
- İlaç yükleme kapasiteleri yüksektir ve bu etkin maddenin hücre içi dağılımını arttırmaktadır (Nagavarma vd., 2012).
- Yüksek kararlılık ve yüksek raf ömrüne sahiptirler.
- Üretim teknikleri genel olarak basit ve kolaydır, hazırlanma maliyetleri düşüktür (Gelperina vd., 2005).
- Hidrofilik ve hidrofobik ilaçlarla uyumludurlar, etki istenilen bir bölgede toplanılabilir, kontrollü salım sağlarlar, aktif ve pasif hedefleme mümkündür (Nagarwal vd., 2009).
- Biyolojik olarak parçalanabilir yapıya sahiptirler ve bu yüzden kullanıldıkları zaman zararlı etki göstermezler (Amgoth vd., 2019).

2.5. PLGA

Polimerik nanopartiküllerin biyo davranışı kullanılan biyobozunur polimerlere göre değişiklik göstermektedir. PLGA biyobozunur polimerler sırasında yer almakta olup insanlarda kullanılması için FDA tarafından onaylanmıştır (Cañadas vd., 2016).

Polimerik nanopartikül sistemlerinde PLGA'nın geniş kullanımı onun inert bileşimi, stabil bozunma hızı, yani onu oluşturan laktik asit ve glikolik asitten kaynaklanmaktadır. PLGA içerikli nanopartiküller mekanik stabilitesinin iyi ve boyut dağılımının dar olması ile karakterize edilirler. Matris olarak kullanılan PLGA oral uygulamadan sonra ilacın enzimatik bozulmasını engeller (Moritz vd., 2015). Olumlu bozunma özellikleri ve hidrolizden sonra Krebs döngüsü yoluyla vücuttan kolayca atılabilen toksik olmayan metabolit monomerlerinin (laktik asit ve glikolik asit) üretimi gibi PLGA polimerlerinin birçok avantajı bildirilmiştir. PLGA'nın ilaç dağıtımında büyük bir potansiyeli olmasına rağmen, PLGA nanopartiküllerinin *in vivo* uygulanması zayıf su stabilitesi ve geniş nanopartikül çapı nedeniyle sınırlıdır, bu da nanopartiküllerin vücuttan hızlı arınmasına yol açar (Khaledi vd., 2020). PLGA nanopartikülleri negatif yüklere sahiptir ve yüzey modifikasyonu ile nötr veya pozitif yüklere dönüştürülebilir (Danhier vd., 2012).

2.5.1. PLGA nanopartiküllerinin hazırlanması

Literatürde PLGA bazlı nanopartiküllerin nanoçöktürme yöntemi ile hazırlanması oldukça popülerdir. Nanoçöktürme yönteminde kullanılan polimer ve ilaç, aseton, asetonitril, etanol veya metanol gibi suyla karışan çözücü içinde çözündürülür. Ardından bu çözelti damla damla içerisinde yüzey etkin madde bulunan karışıma ilave edilir. Hızlı çözücü difüzyonu ile nanopartiküller oluşur ve en son aşamada çözücü uzaklaştırılır. Bu yöntemde dikkate alınması gereken bazı hususlar vardır. Bunlar; polimer/yüzey etkin madde oranı, polimer konsantrasyonu, yüzey etkin madde özelliği ve konsantrasyonu, çözücü yapısı, viskozite, katkı maddeleri, etkin maddeler ve damlatma parametreleridir (Astete ve Sabliov, 2006).

2.5.2. PLGA fizikokimyasal özellikleri

PLGA'nın fizikokimyasal özellikleri kontrollü salım sistemlerinin tasarımı için birçok olanak sağlar. Bununla birlikte, PLGA nanopartiküllerinin en önemli dezavantajı, hücreler ve proteinlerle seçici olmayan etkileşimleridir ve hedef olmayan dokularda ilaç birikimine yol açmasıdır. Biyolojik olarak aktif ligandlarla etkili kovalent bağlanma için uygun fonksiyonel grupların olmaması başka bir dezavantaj yaratır. Bu nedenle, PLGA nanopartikülerinin fiziksel ve kimyasal yüzey modifikasyonu üzerinde bazı girişimlerde bulunulmuştur (Chen vd., 2009). PLGA ile hazırlanan nanopartiküller vücutta yüzey

erozyonu veya yığın erozyonu sonucunda parçalanarak polimerin hidrolizine neden olmaktadır. İlacın dissolüsyonu da bu hidrolizden kaynaklanarak dört aşamada gerçekleşir. İlk aşama suyun difüzyonu, ikinci aşama asit özellikli grupların hidrolizi, üçüncü aşama oligomerlerin partiküllerin dışına difüze olması ve en son aşamada su molekülleri boşluklardan difüze olmasıdır. Üçüncü aşamada polimerlerde belli oranda kütle kaybı oluşur ve ilacın dissolüsyonunda artış görünür. En son evrede ise polimerik matrikste gözenekler belirgin şekilde görülmeye başlar ve ilaç bozunması homojen ve yavaş bir şekilde ilerler (Parikh vd., 2011).

2.6. Kitosan

Nanopartiküllerin üretiminde yaygın olarak kullanılan polimerlerden biri de polisakkarit olan kitosandır. Mukozal yüzeylere yapışması, ilaç dağıtımında etkili olması, katyonik yüzeye sahip olması bu polisakkaridin başarılı kullanılmasında etkili olmuştur (Grenha, 2012).

Kitosan biyobozunur, düşük toksisiteye sahip, biyolojik olarak uyumlu, antibakteriyel özellikli bir polimerdir (Chen vd., 2009). Kitosan biyolojik olarak parçalanabilen özellikli olduğu için insan vücudunda kolayca emilen güvenli bileşiklere parçalanmaktadır (Shariatinia, 2019).

Gıda, eczacılık, kozmetik gibi çeşitli alanlarda kullanılan kitosan yenilebilir olması, toksisite oluşturmaması nedeniyle büyük ölçekte ilgi görmüştür (Zhang vd., 2010).

Yapısında çeşitli amin gruplarını bulunduran bu polimer yüzey modifikasyon ajanı olarak kullanılmaktadır (Zhang vd., 2015). Yüksek pozitif zeta potansiyeline sahip olan kitosan modifiye edilmiş PLGA nanopartikülleri başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Wang vd., 2013). Düşük pH'de amino gruplarının protonlanması, kitosan makromoleküllerini pozitif yüklü hale getirir ve bu da kitosanın mukozal yapışmasına yol açar. Bu nedenle, kitosan kullanılırken pH değeri dikkate alınmalıdır (Lu vd., 2019).

Kitosan nanopartikülleri iyi kararlılık, toksik etkinin az olması, kolay hazırlanma yöntemi, asidik sulu çözeltilerde çözünebildikleri için partikül üretirken tehlikeli organik çözücülerin kullanılmaması gibi avantajlara sahiptir (Nagpal vd., 2010). Nemlendirici ve iyi emici özelliklere sahiptir. Su ve birçok organik çözücülerde çözünmemesi kitosanın bir dezavantajıdır. Kitosanın çözünürlüğünün iyileştirilmesi olukça önemli bir konudur. Günümüzde üç yöntemle kitosanın çözünürlüğünü geliştirmek mümkündür:

1. Kitosanın orijinal hidrojen bağını ve kristalliğini yok etme yöntemi.

2. Kitin deasetilasyonu
3. Kimyasal modifikasyon (Wang vd., 2020).

2.7. Vitamin A Palmitat

2.7.1. Vitamin A Palmitat'ın özellikleri

Vitamin A palmitat (VAP, Retinil palmitat) sarı renkli, kristal veya amorf şeklinde olan bir tozdur. Çoğu organik çözücüde (etanol, aseton, kloroform), katı ve sıvı yağda çözünür, su ve gliserolde çözünmez. Erime noktası: 27-29 ° C, kaynama noktası: 760 mm Hg'de 607,5 °C'dir (Bernauer vd., 2016). Işık ve oksijen gibi ortam koşullarından dolayı bozulmaya meyillidir (Argimón vd., 2017). Cildin, saçların sağlıklı oluşumunda, korunmasında etkili olan VAP aynı zamanda derinin üst tabakasını temizler, elastikliğini arttırır, pürüzsüz hale getirir, ciltte yer alan lipitlerin perokidasyonunu engeller, cildi yeniler ve daha doğal ve genç görünüm kazandırır. VAP antioksidan özelliğe sahiptir. Kolajen kaybını önler ve hücre yenilenmesinde rol alır. Bu ve nemlendirici özelliklerine istinaden topikal olarak jel ve kremlerde kullanılmıştır (Argimón vd., 2017).

Kozmetik bir bileşen olarak VAP vücut losyonlarında maksimum %0.05, yüz ve el kremlerinde %0.3 konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Yaşlanma karşıtı özelliğinden dolayı günümüzde daha aktif kullanılan VAP, aynı zamanda diş eti sorunlarının giderilmesinde de terapötik ajan haline gelmiştir (Bernauer vd., 2016).

2.7.1.1. *UV etkinlik*

VAP ultraviyole ışığı emen konjuge çift bağlara sahip yan zincirler içerir. Yapılan hayvan deneyleri retinoidlerin, UVB'den kaynaklanan hücre apaptozunun ve DNA ışığı hasarının etkili bir şekilde önlenebildiği görülmüştür (Babamiri vd., 2010).

VAP topikal uygulamada güneşten koruyucu özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir. Genellikle kuru cilde uygulanan VAP, epitelizasyon ve keratinizasyonda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Gaspar vd., 2013).

Vitamin A ve türevleri cilt bariyerini UV radyasyondan korumakla beraber cildi eski haline getiren fotokoruyucu ve antioksidan madde ve türevleridir. Aynı zamanda maksimum 325 nm'de 300 ile 350 nm arasındaki ultraviyole radyasyonu emer. Uzun süre vitamin A kullanımına maruz kalmak, vitamin A'nın ışığa maruz kalması fotoksidasyona uğramasına neden olur. Bu durum alerjik reaksiyonların oluşmasına yol açar (Gaspar vd., 2013). VAP'ın fotohasarı önleyici, yaşlanma sürecini yavaşlatan ve hatta durduran

özellikleri bilinmektedir. Cilt yaşlanması içsel ve dışsal olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. İçsel yaşlanmada genetik faktörler rol oynarken, dışsal yaşlanma daha çok ultraviyole ışığın belirgin bir şekilde ciltle olan temasına bağlıdır (Darlenski vd., 2010).

Son yıllarda VAP'ın güneş koruyucu kremlerde kullanımının arttığı görülmektedir. Aynı zamanda reçeteli ve reçetesiz ilaçlarda da kullanılması FDA tarafından onaylanmıştır (Burnett ve Wang, 2011).

Bazı çalışmalarda A vitamininin güneşten koruyucu özelliğinin olmadığı ileri sürülmüş, antioksidan özelliğinden dolayı güneş kremlerinde kullanıldığı söylenmiştir. Aynı zamanda antioksidan özelliğinden dolayı cilt kanseri riskini azaltan etkiye de sahiptir. Bununla birlikte, vitamin A içerikli kremlerin uzun müddet güneş ışığına maruz kalması ciltte tahrişe, olumsuz etkilere yol açtığı belirlenmiştir (Chapman, 2012) .

2.7.1.2. *Antioksidan aktivite*

Antioksidan maddeler istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarını engelleyerek ürünlerin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Antioksidan maddeler bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda bulunabilir veya kimyasal yollarla sentezlenebilir. Antioksidanlar genellikle insan vücudunu oksidatif hasara karşı korur ve hastalık riskini azaltır. Antioksidan aktivite, hidrojen atomu transferi, tek elektron transferi dahil olmak üzere farklı mekanizmalara sahip çeşitli analizlerle izlenebilmektedir (Shahidi vd., 2015). Vitamin A düşük oksijen basıncında lipid peroksidasyonu sürecinde antioksidan etki gösterir. Aynı zamanda diğer antioksidanlarla (vitamin C, vitamin E) kullanıldığında onların etkisini arttırma özelliğine sahiptir (Silva vd., 2019).

VAP antioksidan etkisi sayesinde kolajen sentezini güçlü bir şekilde uyararak MMP 1 (kollajenaz 1) ekspresyonunu azaltır. Bu da VAP'ın yaşlanma karşıtı kremlerde kullanılmasını arttırmıştır. VAP ile ciltte yaşlanmanın, UV radyasyondan kaynaklanan ince kırışıklıkların, cilt elastikliyinin, pigmentasyonun azaltabildiği görülmüştür. Günümüzde de en sık kullanılan yaşlanma karşıtı madde olarak tanımlanmaktadır ve diğer vitamin A türevleriyle kıyaslandığında, ciltte daha az tahrişe neden olduğu görülmektedir (Ganceviciene vd., 2012).

Antioksidanlar topikal olarak cilt bakımı uygulamalarında kullanıldıklarında bazı durumlarda kimyasal dengesizlik ve cilde zayıf penetrasyon gibi olumsuz özellikler segileyebilmektedir. Bu sebepten dolayı kozmetiklerin performansını iyileştirmek (cilde penetrasyonu arttırmak için) adına nanopartikül gibi taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır (Hameed vd., 2019).

2.7.1.3. *Yaşlanma karşıtı etki*

İnsan cildi içsel ve dışsal olarak zaman geçtikçe yaşlanmaya maruz kalır. İçsel yaşlanma doğal fizyolojik değişikliklerin sonucudur. Dışsal yaşlanmanın nedenleri ise çevresel faktörler ve UV (ultraviyole) ışınlarına uzun süre maruz kalmaktan kaynaklanır. Yaşlanmanın en önemli ve dışsal belirtisi kırışıklıktır. Bununla birlikte hiperpigmentasyon ve cilt sarkmaları da gözükmektedir. Yaşlanma ile beraber cilt elastikliğini kaybeder ve kuruluk ortaya çıkar (Farooq vd., 2018).

Yaşlanma karşıtı etkili olan VAP önce stratum korneum'a penetre olur, daha sonra ise dermise nüfüz eder. Buradaki keratinositlere ulaştığında iç kısmına girerek uygun reseptöre bağlanır. VAP genellikle 4 reseptörü - keratinositler, fibroblastlar, melanositler ve Langerhans hücrelerini uyarır. Keratinosit hücreleriyle etkileşime geçerek proliferasyonunu destekler, deriden su kaybını azaltır, kolajenin bozulmasını engeller ve derinin üst tabakasının koruyucu özelliğini arttırır (Zasada vd., 2019).

2.7.1.4. *Yara iyileştirme*

Yara iyileşmesi dört aşamada olmaktadır. Bunlar; hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve yeniden şekillenmedir. Bu aşamalarda biri diğerini izlemektedir ve bir aşamada oluşan sorun diğer aşamayı da etkilemektedir (Zinder ve Vlad, 2019).

1920'lerden bu yana vitamin A eksikliğinin keratinizasyona sebep olduğu kanıtlanmıştır. Bundan başka akne vulgaris, sedef hastalığı, fotohasar gibi çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde de kullanılmış ve günümüzde de kullanımı devam etmektedir (Polcz ve Barbul, 2019). 1968'de Ehrlich vitamin A'nın kortizonun etkisini yok ettiğini, bununla da yara iyileşmesini aktive ettiğini kanıtlamıştır. Bundan birkaç yıl sonra Hermann ve Woodward, vitamin A'nın hayvanlarda topikal olarak uygulanması sonucu yara iyileşmesini hızlandırdığını kanıtlayan deneyler gerçekleştirmiştir. Vitamin A'nın yara iyileştirmesindeki mekanizması, lizozomal membran stabilitesini azaltarak makrofaj akışını ve aktivasyonunu arttırmak ve kolajen sentezinin uyarılmasıdır (Zinder ve Vlad, 2019). Vitamin A lazer, kimyasal soyma, dermabrazyon gibi cilt işlemlerinin öncesi ve sonrasında uygulandığında diğer bölgelere istinaden daha erken iyileşme sağladığı, cildi pürüzsüzleştirdiği, bu cildin tedaviye daha erken yanıt verdiği gözlemlenmiştir (Hubbard vd., 2014). Vitamin A'nın topikal kullanımı sırasında en çok görülen yan etkisi eritem, kuruluk ve kaşıntıyla ortaya çıkıyor. Bu da bazı durumlarda retinoidlerin genelinin

kullanımında sınırlar olması gerektiğinin bir göstergesidir (Riahi vd., 2016). VAP içeren piyasada bulunan bazı müstahzarlar Tablo 2.3.'te sunulmuştur.

Tablo 2.3. *Piyasadaki müstahzarlar* (*Retinol (A Vitamini) İçeren Tüm Kremler - Begonya*, n.d.)

Preparat ismi	**Marka**
First Aid Beauty FAB Skin Lab Retinol Serum	Skin Lab
Intensive Clarity Treatment 0.5% Pure Retinol Night	PCA Skin
Revitalift Anti-Wrinkle and Firming Eye Cream	Loreal Paris
Retinol Correxion Anti-Aging Eye Cream	RoC
Youth Dose Eye Treatment Cream	Kiehl's
Skincare 24/7 Retinol Eye Cream	Dr. Brandt
Crystal Retinal 3	Medik8
Granactive Retinoid 2% in Squalane	The Ordinary
A+ High -Dose Retinoid Serum	Sunday Riley

Advanced Night Repair Eye Supercharged Complex	Estée Lauder

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Madde adı	Firma adı
Asetik asit	Sigma-Aldrich, Almanya
Aseton	Merck, Almanya
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Sigma-Aldrich, Almanya
Etanol	Carlo Erba, Fransa
Fetal sığır serumu	Sigma Aldrich Almanya
İmmünofloresan boya (Hoechst 33258)	Cell Signaling Technology Hollanda
Kitosan (LMW)	Sigma-Aldrich, İzlanda
L-glutamin	Sigma–Aldrich Almanya
Penisilin/Streptomisin	Gibco ABD

Pluronik F-68	Alfa Aesar, Almanya
Potasyum fosfat monobazik	Sigma-Aldrich, Almanya
Resomer RG 502 H (PLGA)	Sigma-Aldrich, Amerika
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich, Almanya
Span 60	Sigma-Aldrich, Amerika
Tripan mavisi	Roche Almanya
Tween 80	Merck, Almanya
Vitamin A Palmitat	Dermoskin, Türkiye

3.2. Kullanılan Cihazlar

Cihaz adı	**Firma Adı**
Buz Dolabı	Arçelik, Türkiye
Cytation 3 Multi-mode	Reader Biotek, ABD
Derin Dondurucu	Liebherr LGEX 3410 Medline, İsviçre
Distile su cihazı	MiliQ Milipore, Fransa
Hassas terazi	Ohaus E1 2140, ABD
Hücre sayım cihazı	Cedex XS, Almanya
Hücre kazıyıcı	Greiner Bio-One ABD
Liyofilizatör	Scanvac-Coolsafe Pro, Danimarka
Manyetik karıştırıcı	Jeiotech MS-53M, Güney Kore
Mikropipet seti	Eppendorf, Almanya
Oris™ Cell Seeding Stoppers	Platypus Technologies, CMA5.101

Oris™ Stopper Tool	Platypus Technologies, CMA5.101
pH metre	WTW Profi Lab pH 597, Almanya
Prob sonikatör	Sonics, Amerika
Santrifüj 1	Eppendorf 5810, Almanya
Santrifüj 1	Nüve NF400, Türkiye/
Su banyosu	GFL, Tissue float bath 1052, Almanya
The Oris™ Cell Migration Assay	Platypus Technologies, CMA5.101
Ultrasonik banyo	Wisd Laboratory Instruments, Kore
UV-Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vorteks	Jeo Tech, Kore
Zetasizer	Malvern Nano ZS, İngiltere

4. YÖNTEM

4.1. Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları

İlaç araştırmalarında kullanılan analitik yöntemin doğrulanması ya da validasyonunun başlıca amacı, uygulanacak olan yöntemin amaçlanana uygun olduğunu ortaya çıkarmak ve bunu kanıtlamaktır. Bu sebeple uygulanan analiz yönteminin kesinlik ve doğruluk göstergeleri analiz sonuçlarından elde edilen verilerle kanıtlanarak gösterilmektedir. Bu tez çalışmasında miktar tayini validasyonunda; doğrusallık, kesinlik, duyarlılık ve doğruluk gibi analitik parametreler merkeze alınmış, istatistiksel ve matematiksel açıdan değerlendirilmiştir. Analitik miktar tayini için validasyon çalışmalarında, Uluslararası Harmonizasyon Birliği'nin (ICH) Analitik İşlem Validasyon Yöntemi kullanılmıştır (Borman ve Elder, 2017). Bu tez çalışmasında hem miktar tayini hem de dissolüsyon çalışmalarında kullanılmak üzere iki farklı analitik yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Formülasyonda etkin madde miktar tayini ve ardından yapılacak olan *in vitro* dissolüsyon çalışmasına başlamadan önce VAP miktar tayini için analitik yöntem validasyon çalışması yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarda VAP miktar tayini için UV spektrofotometre kullanılmıştır. Yöntem geliştirme çalışmalarına öncelikle VAP için

maksimum absorbans değeri bulunarak başlanılmış ve ardından doğrusallık çalışması yapılmıştır. UV absorbans değerinin bulunması için 1:1 *h/h* oranında etanol: aseton içeren ve %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 çözücü ortamında VAP'ın UV spektrumu alınmış ve analizlerin yapılacağı maksimum dalga boyu (λ_{maks}) belirlenmiştir. UV Spektrofotometri yönteminin validasyon çalışmalarında ICH klavuzları doğrultusunda doğruluk, doğrusallık, duyarlılık kesinlik parametreleri değerlendirilmiştir (Silva-Buzanello vd., 2015).

4.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması

VAP için seçici UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. UV yöntemi, bir UV/vis Spektrofotometresi (UV- 160A, Shimadzu) üzerinde 330 nm'de ve kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.1.1. *Doğrusallık*

Bir analitik yöntemin doğrusallığı, verilen ilaç ya da kullanılan etkin madde konsantrasyon aralığında analizi yapılan maddeyi farklı konsantrasyonlarda içeren örneklerin elde edilen absorbans ile doğru orantılı olmasıdır. Doğrusallık çalışmasında, çözelti konsantrasyonunun fonksiyonu olarak absorbans elde edilmektedir. Doğrusallık analizinde, regresyon analiz ve istatistiksel yöntemlerle değerlendirme yapılmaktadır. Doğrusallık çalışması için en az altı konsantrasyonda çalışılması tavsiye edilmektedir.

UV yönteminde kullanılacak olan VAP'a ait standart eğrinin ve regresyon denkleminin elde edilebilmesi amacıyla öncelikle stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti hazırlamak için, öncelikle tam olarak tartılmış 25 mg VAP, etanol: aseton (1:1) ile yıkanarak balon jojeye alınıp 25 mL hacime etanol: aseton (1:1) karışımı ile tamamlandıktan sonra on dakika ultrasonik banyoda tutulması ile hazırlanmıştır. Sonuç stok çözeltininin konsantrasyonunun 1000 $\mu g.mL^{-1}$ olmasından hareketle, çeşitli seyreltmeler ile 2-10 $\mu g.mL^{-1}$ aralığında altı değişik konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Analizler sonucunda altı nokta için VAP konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerleri bulunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ile regresyon analizi yapılıp VAP'a ait regresyon denklemi ve denkleme ait determinasyon katsayısı (r^2) bulunmuştur. Çalışma n=3 olacak şekilde yapılmıştır.

4.1.1.2. *Kesinlik*

Kesinlik analitik yöntem validasyonunda; tekrareldeedilebilirlik, ara kesinlik ve tekrarlanabilirlik olarak saptanabilmektedir.

Tekrarlanabilirlik, aynı işlem koşullarını uygulayarak ve kısa zaman biriminde kesinliği ifade etmektedir. Yöntemin tekrarlanabilirliği, aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin absorbans ölçümünü tekrarlamakla elde edilmektedir.

Ara ürün kesinliğinde, birbiri ile ilişkisi bulunmayan durumların ya da farklı değişkenlerin (günler, analistler, kullanılan malzeme ve cihazlar) analitik yöntemin kesinliği üzerine etkisi bulunmaktadır. Tekrareldeedilebilirlik ise farklı laboratuvarlarda analizlerin ve deneylerin tekrarlanarak, sonuçlar arasında olan kesinliğin belirlenmesidir. Yöntemin standardizasyonu için genelde farklı birimler ile ortak çalışmalar yapılmaktadır, bu zorunlu olmayan bir validasyon parametresidir. Yöntemin kesinlik çalışmalarında, tekrarlanabilirliğini göstermek için kalibrasyon aralığına denk gelen 3 farklı konsantrasyonda (4 $\mu g.mL^{-1}$, 6 $\mu g.mL^{-1}$, 10 $\mu g.mL^{-1}$) VAP içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 ölçüm tekrarı yapılmıştır.

4.1.1.3. *Doğruluk*

Doğruluk, uygulanan analitik yöntem ile elde edilen test sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığı demektir. Doğruluk çalışmaları, 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerin analizlerinin en az 3 kez tekrar edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Sonuçlar % verim ve her seri için bağıl standart sapma olarak verilir.

Doğruluk, işlemin başında numunelere eklenen bilinen miktarlarda VAP referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir. Bu amaçla, doğru bir şekilde tartılmış 10 mg VAP 100 mL'lik hacimli balona aktarılmış ve 1:1 etanol: aseton içinde çözündürülmüştür (son konsantrasyon 100 $\mu g.mL^{-1}$). Bu çözeltiden hareketle doğruluk çalışması için 4, 6 ve 10 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler üç kopya halinde hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

4.1.1.4. *Duyarlılık*

Uygulanan analitik yöntemlerin düşük konsantrasyonları saptayabilme yeteneğidir. Miktar tayini sınırı (LOQ) ve saptama sınırı (LOD) hesaplanarak değerlendirilmektedir.

LOD, standart madde sinyalinin geri plan gürültüsünden ayrılabilmesi içi gerekli olan en düşük madde miktarı olarak tanımlanabilmektedir. Metodun aletli olup olmamasına bağlı olarak LOD değerinin belirlenmesinin birçok yöntemi bulunmaktadır. Yöntemler sinyal-gürültü oranı, görsel değerlendirme ve elde edilen cevabın ve eğimin standart sapması olarak sıralanabilir.

Sistemin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimi olan saptama sınırı LOD değeri Denklem 4.1. yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\mathrm{LOD} = \frac{3.3 \times \mathrm{SS}}{\mathrm{m}} \tag{4.1.}$$

Burada, SS; y ekseni kesim noktasının standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimidir.

LOQ, standart maddenin güvenilir bir şekilde doğru ölçümünün yapılabilmesi için gerekli olan en düşük madde miktarıdır. LOD değerinin belirlenmesi için kullanılan metodlar LOQ için de uygulanabilmektedir.

Analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebildiği miktar tayini alt sınırı LOQ değeri denklem 4.2. kullanılarak belirlenmiştir.

$$\mathrm{LOQ} = \frac{10 \times \mathrm{SS}}{\mathrm{m}} \tag{4.2.}$$

Eşitlik 2'deki SS; y ekseni kesim noktasının standart sapması, m ise korelasyon eşitliğinin eğimidir.

4.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması

VAP için seçici UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. UV yöntemi, bir UV/vis Kayıt Spektrofotometresi UV-160A (Shimadzu) üzerinde 330 nm'de ve kuvars küvet kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.2.1. *Doğrusallık*

UV yönteminde kullanılacak olan VAP'a ait standart eğrinin bulunabilmesi için stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözelti, tam olarak tartılmış 25 mg VAP, %1 Tween 80 içeren fosfat tamponu (PBS) pH 6.8 ile yıkanarak balon jojeye alınıp 25 mL hacime mobil faz ile tamamlandıktan sonra 10 dakika ultrasonik banyoda tutulması ile hazırlanmıştır. Sonuç stok çözeltininin konsantrasyonunun 1000 $\mu g.mL^{-1}$ olmasından hareketle, çeşitli seyreltmeler ile 2-10 $\mu g.mL^{-1}$ aralığında altı farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Analizler sonucunda altı nokta için VAP konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans değerleri bulunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri ile regresyon analizi yapılıp VAP'a ait regresyon denklemi ve denkleme ait determinasyon katsayısı (r^2) bulunmuştur. Çalışma n=3 olacak şekilde yapılmıştır.

4.1.2.2. *Kesinlik*

Kesinlik çalışmalarında, tekrarlanabilirliği göstermek için kalibrasyon aralığına denk gelen 3 farklı konsantrasyonda (4 $\mu g.mL^{-1}$, 6 $\mu g.mL^{-1}$, 10 $\mu g.mL^{-1}$) VAP içeren çözeltiler hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 6 ölçüm tekrarı yapılmıştır.

4.1.2.3. *Doğruluk*

Doğruluk, işlemin başında numunelere eklenen bilinen miktarlarda VAP referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir. Bu amaçla, doğru bir şekilde tartılmış 10 mg VAP 100 mL'lik hacimli balona aktarılmış ve %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 içinde çözündürülmüştür (son konsantrasyon 100 μgmL^{-1}). Bu çözeltiden hareketle doğruluk çalışması için 4, 6 ve 10 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır. Tüm çözeltiler üç kopya halinde hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

4.1.2.4. *Duyarlılık*

Uygulanan analitik yöntemlerin küçük konsantrasyonları saptayabilme yeteneğidir. Saptama sınırı (LOD) ve miktar tayini sınırı (LOQ) hesaplanarak değerlendirilmektedir.

Sistemin kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimi olan saptama sınırı LOD ve LOQ değerleri '4.1.1.4. Duyarlılık' bölümünde verilen eşitlikler (bkz. Denklem 4.1. ve bkz. Denklem 4.2.) yardımıyla hesaplanmıştır.

4.2. Vitamin A Palmitat Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Hazırlanması

Bu tez çalışmasında hazırlanan tüm formülasyonlar nanoçöktürme tekniği ile hazırlanmıştır. Farklı oranlarda kitosan çözeltilerinin hazırlanması için %1 Asetik asit sulu çözücüsü kullanılmış ve tüm kitosan çözeltileri *a/h* oranına göre hazırlanmıştır. Tez kapsamında Resomer RG 502 H isimli PLGA polimeri ile çalışılmıştır. **Tablo 4.1.**'de hazırlanan tüm formülasyonların içerikleri sunulmuştur.

Tablo 4.1. *Formülasyon içerikleri*

Kod	Organik faz çözelti içeriği				Sulu faz çözelti içeriği
	PLGA	**Span 60**	**VAP**	**Aseton**	
Blank-NP-1	60 mg	20 mg	-	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 çözeltisi
NP-1	60 mg	20 mg	6 mg	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 çözeltisi
Blank-NP-2	60 mg	20 mg	-	3 mL	10 mL, %0.2'lik kitosan çözeltisi
NP-2	60 mg	20 mg	6 mg	3 mL	10 mL, %0.2'lik kitosan çözeltisi
Blank-NP-3	60 mg	20 mg	-	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.2'lik kitosan çözeltisi
NP-3	60 mg	20 mg	6 mg	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.2'lik kitosan çözeltisi
Blank-NP-4	60 mg	20 mg	-	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.1'lik kitosan çözeltisi
NP-4	60 mg	20 mg	6 mg	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.1'lik kitosan çözeltisi
Blank-NP-5	60 mg	20 mg	-	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.05'lik kitosan çözeltisi

NP-5	60 mg	20 mg	6 mg	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.05'lik kitosan çözeltisi
Blank-NP-6	60 mg	20 mg	-	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.025'lik kitosan çözeltisi
NP-6	60 mg	20 mg	6 mg	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.025'lik kitosan çözeltisi
Blank-NP-7	60 mg	20 mg	-	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.0125'lik kitosan çözeltisi
NP-7	60 mg	20 mg	6 mg	3 mL	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.0125'lik kitosan çözeltisi

4.2.1. Blank-NP-1 kodlu formülasyonun hazırlanması

Blank-NP-1 kodlu etkin maddesiz plasebo/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.2. NP-1 kodlu formülasyonun hazırlanması

VAP içeren NP-1 kodlu PLGA nanopartikülerinin hazırlanması için %10 (6 mg) VAP, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk

santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.3. Blank-NP-2 kodlu formülasyonun hazırlanması

Blank-NP-2 kodlu etkin maddesiz plasebo/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.2'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.4. NP-2 kodlu formülasyonun hazırlanması

VAP içeren NP-2 kodlu PLGA nanopartikülerinin hazırlanması için %10 (6 mg) VAP, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.2'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.5. Blank-NP-3 kodlu formülasyonun hazırlanması

Blank-NP-3 kodlu etkin maddesiz plasebo/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.2'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj

uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.6. NP-3 kodlu formülasyonun hazırlanması

VAP içeren NP-3 kodlu PLGA nanopartikülerinin hazırlanması için %10 (6 mg) VAP, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.2'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.7. Blank-NP-4 kodlu formülasyonun hazırlanması

Blank-NP-4 kodlu etkin maddesiz plasebo/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.1'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.8. NP-4 kodlu formülasyonun hazırlanması

VAP içeren NP-4 kodlu PLGA nanopartikülerinin hazırlanması için %10 (6 mg) VAP, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.1'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj

uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.9. Blank-NP-5 formülasyonun hazırlanması

Blank-NP-5 kodlu etkin maddesiz plasebo/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.05'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.10. NP-5 kodlu formülasyonun hazırlanması

VAP içeren NP-5 kodlu PLGA nanopartikülerinin hazırlanması için %10 (6 mg) VAP, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.05'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.11. Blank-NP-6 kodlu formülasyonun hazırlanması

Blank-NP-6 kodlu etkin maddesiz plasebo/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.025'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika

boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.12. NP-6 kodlu formülasyonun hazırlanması

VAP içeren NP-5 kodlu PLGA nanopartikülerinin hazırlanması için %10 (6 mg) VAP, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.025'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.13. Blank-NP-7 formülasyonun hazırlanması

Blank-NP-3 kodlu etkin maddesiz plasebo/blank formülasyonun hazırlanması için ilk olarak, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.0125'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.2.14. NP-7 kodlu formülasyonun hazırlanması

VAP içeren NP-5 kodlu PLGA nanopartikülerinin hazırlanması için %10 (6 mg) VAP, PLGA (60 mg) ve Span 60 (20 mg) 3 mL aseton içinde çözündürülmüştür. Daha sonra, elde edilen bu çözelti 5 mL.saat^{-1} hızda manyetik karıştırıcı üstündeki 10 mL %0.5'lik (*a/h*) Pluronic F-68 içeren %0.0125'lik (*a/h*) kitosan sulu çözeltisine damlatılmıştır. Ardından, aseton oda ısısı koşulunda buharlaştırılmış ve sulu çözeltiden nanopartiküllerin toplanması için 11.000 rpm karıştırma hızında, 4°C sıcaklıkta 30 dakika

boyunca santrifüj uygulanmıştır. İlk santrifüj prosesi bittikten sonra toplanan nanopartiküller 15 mL distile su içinde dağıtılmış ve aynı santrifüj prosesi uygulanmıştır. Nanopartiküllerin yıkanabilmesi için bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

4.3. Çalışma Koşulunda Kararlılık

4.3.1. Formülasyon hazırlama koşulunda kararlılık

Nanopartiküllerin hazırlama koşullarında kararlılık incelenmesi, '4.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması' bölümünde anlatıldığı şekilde VAP miktarının belirlenmesine dayanarak yapılmıştır (Öztürk, 2017).

Bu çalışmada nanopartikül hazırlanması sırasında nanoçöktürme yöntemi kullanılmıştır. Nanopartikül hazırlama koşulunda vitamin A palmitatın stabilitesini test etmek için ilk başta VAP aseton içinde çözülmüş, sıkı bir şekilde kapatılmış reaksiyon şişesine alınarak ultrasonik banyoda 1 saat süresince bekletilmiş ve UV spektrofotometre ile miktar tayini yapılmıştır (n=3).

Kararlılık çalışmasını ikinci aşamasında ise öncelikle VAP aseton içinde çözülmüş, sıkıca kapatılmış reaksiyon şişesine alınmıştır. VAP çözündükten sonra 10 mL miktardaki farklı sulu fazlara 5 $mL.saat^{-1}$ hızda manyetik karıştırıcı üstünde damlatılmıştır. Proses tamamlandıktan sonra UV spektrofotometre ile miktar tayini yapılmıştır (n=3).

İlgili sulu fazlar aşağıdaki gibidir.

- 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 çözeltisi
- 10 mL, %0.2'lik kitosan çözeltisi
- 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.2'lik kitosan çözeltisi
- 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.1'lik kitosan çözeltisi
- 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.05'lik kitosan çözeltisi
- 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.025'lik kitosan çözeltisi
- 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.0125'lik kitosan çözeltisi

4.3.2. Enkapsülasyon etkinliği tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık

Nanopartiküllerin etkin madde miktar tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık incelenmesi, '4.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında

validasyon çalışması' bölümünde anlatıldığı şekilde VAP miktarının belirlenmesine dayanarak yapılmıştır (Öztürk, 2017).

Etkin maddenin kararlılığı VAP'ın formülasyolardan ekstraksiyonunda kullanılan etanol:aseton (1:1) karışımı altında 10 dk ultrasonikasyon altında incelenmiş ve miktar tayini UV spektrofotometre ile yapılmıştır (n=3).

4.3.3. *In vitro* dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık

Nanopartiküllerin *in vitro* dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık incelenmesi, '4.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması' bölümünde anlatıldığı şekilde VAP miktarının belirlenmesine dayanarak yapılmıştır (Öztürk, 2017).

Etkin maddenin kararlılığı *in vitro* disolüsyon ortamı olan %1 oranında Tween 80 içeren PBS'de (pH 6.8) ve 37°C'de *in vitro* dissolüsyon çalışması süresi olan 72 saat boyunca incelenmiş ve miktar tayini UV spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir (n=3).

4.4. Vitamin A palmitat yüklü nanopartikül formülasyonlarının karakterizasyonu

4.4.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı

Hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyutu ve dağılımı (PDI) formülasyonların distile suda dağıtılması ile ölçülmüştür. Bu ölçümlerde Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır.

4.4.2. Zeta potansiyel

Hazırlanan nanopartiküllerin zeta potansiyel değerini ölçmek için Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Zeta potansiyel değeri tek kullanımlık katlanmış kılcal zeta hücresinde, 25°C oda sıcaklığında ve formülasyonların distile su ile seyreltilmesiyle belirlenmiştir.

4.4.3. Enkapsülasyon etkinliği

Hazırlanan nanopartikül formülasyonunda enkapsülasyon etkinliği '*4.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması* 'bölümünde anlatıldığı şekilde VAP miktarının belirlenmesine dayanmaktadır.

5 mg liyofilize nanopartikül formülasyonu üzerine 1 mL etanol: aseton (1:1) eklenmiş ardından nanopartikül yapısını parçalamak için 2 dakika prob sonikasyon

işlemine tabi tutulmuştur. Prob sonikasyon işlemi ardından 11.000 rpm hız ile 5 dk süreyle santrifüj edilmiş ve üst kısımda kalan saydam kısım alınmış ve örnek poliamit süzgeçten süzülerek gerekli seyreltmelerin ardından ait UV spektrofotometre metodu ile analiz edilmiştir. Yapılan tüm bu deneyler sonucu aşağıda verilen denklem 4.3. yardımı ile enkapsülayon etkinliği (%) hesaplanmıştır.

$$Enkapsülasyon\ etkinliği\ (\ \%\ EE) = \left[\frac{FEMTM - EEEMM}{FEMRM}\right] X\ 100$$

FEMTM: Formülasyondaki etkin maddenin teorik miktarı,* ***EEEMM**: enkapsüle edilen etkin madde miktarı*

(4.3.)

4.4.4. *In vitro* dissolüsyon

VAP yüklü nanopartikül formülasyonlarının *in vitro* dissolüsyon çalışması 72 saat boyunca araştırılmıştır. Nanopartiküllerden VAP dissolüsyonu diyaliz membranı kullanılarak test edilmiştir. 5 mg VAP ve 5 mg'a eşdeğer miktarda VAP içeren nanopartiküller selüloz asetat diyaliz membranına (molekül ağırlığı:12-14 kDa) konulmuş ve üzerine 1 mL çözündürme ortamı ilave edildikten sonra diyaliz membranının her iki ucu kapatılmıştır. Ardından diyaliz membranı, 100 rpm'de sürekli olarak karıştırılan 37±0.5°C'de çözünme ortamı olarak 100 mL ortam içine atılmıştır. Dissolüsyon ortamı olarak topikal ilaç taşıyıcı sistemler için sıklıkla kullanılan %1 Tween 80 içeren fosfat tamponu (PBS) pH 6.8 kullanılmıştır. Reseptör kompartman, çözünme ortamının buharlaşmasını önlemek için sıkıca kapatılmıştır. 2 mL numune düzenli aralıklarla alınmış ve aynı hacim yerine taze çözünme ortamı eklenmiştir. Daha sonra numuneler VAP için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışmasında geliştirilmiş UV spektrofotometre metodu ile test edilip % kümülatif çözünen miktar-zaman grafiğine dönüştürülmüştür.

4.4.5. Dissolüsyon kinetiği

In vitro dissolüsyon deneyinin ardından hazırlanan formülasyonlar için zamana karşı % kümülatif çözünen miktar hesaplanmıştır. Hesaplamadan sonra veriler DDSolver programına aktarılmıştır. Dissolüsyon kinetik modeli seçimi için Akaike bilgi kriteri (AIC), korelasyon katsayısı (r^2), düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$) ve Model seçme kriteri (MSC) kriter olarak belirlenmiştir. Değerlendirmede en yüksek r^2, $r^2_{adjusted}$, MSC değeri ile en düşük AIC değeri baz alınmıştır.

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.5.1. Keratinosit hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması, deneylere hazırlık ve hücre sayımları

HaCaT keratinosit hücreleri, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde 37 °C'de, %20 fetal bovin serumu (FBS), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin ve %1 sodyum piruvat içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) büyüme besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler flask tabanında %70-80 yoğunluğa ulaştığında hücreler pasajlanarak yeni flasklara aktarılmış veya sonraki deneylerde kullanılmak üzere hücre stokları hazırlanmıştır.

Deneylerden önce, uygun hücre sayılarını belirlemek için Tripan mavisi çözeltisi ile hücreler boyanmış ve hücre sayım cihazı Cedex XS (Roche-Innovatis, Almanya) kullanılmıştır.

4.5.2. Keratinosit hücrelerinde hücre proliferasyonunu artıran konsantrasyonların belirlenmesi

Hücre proliferasyonunu artıran konsantrasyonları belirlemek için kullanılmış olan MTT ((3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür) testi, boyanın yapısında bulunan tetrazolyum halkasının canlı hücrelerdeki sağlam mitokondrinin süksinat dehidrojenaz enzimleri aracılığıyla yıkılması sonucunda oluşan formazan tuzunun kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Formazan tuzunun miktarı, hücre canlılığıyla doğru orantılıdır (Stockert vd., 2018).

Öncelikle HaCaT hücreleri büyüme besiyerlerinde çoğaltılmış, 96-kuyucuklu plakalara her kuyucukta $1x10^4$ hücre olacak yoğunlukta ekilmiş ve hücrelerin plaka tabanına yapışması amacıyla 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücreler, 400, 100 ve 10 $\mu g.mL^{-1}$ VAP, aynı miktarlarda VAP nanopartikül formülasyonu (NP-1-7) ve çözücü kontrolünü içeren konsantrasyon grupları (Blank NP-1-7) ile 24 saat muamele edilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda her bir 96'lık

kuyucuktaki besiyerleri atılarak 100 µL temiz besiyeri içerisinde 10 µL MTT (0,5 mg.mL^{-1}) reaktifi kuyucuklara ilave edilmiştir. 3 saat sonra kuyucuklardaki besiyeri atılarak her kuyucuğa 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklenmiş ve 540 ve 570 nm dalga boyunda, Cytation 3 Multi-mode Reader cihazında (Biotek, Amerika Birleşik Devletleri) her bir grupta 8 kuyucuk olacak şekilde absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olarak çalışılmıştır. Sonuçlar canlılık formülüne göre hesaplanıp % hücre canlılık olarak belirlenmiştir (Kaya-Tilki vd., 2016) (**Denklem 4.4.**).

$$\%\ Canlılık = \frac{Örneğin\ absorbans\ değeri}{Kontrolün\ absorbans\ değeri} \times 100 \quad (4.4.)$$

4.6. Nanopartiküllerin Yara İyileştirici Etkilerin Belirlenmesi

Bu çalışma The Oris™ Cell Migration Assay kiti kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde Oris™ Cell Seeding Stoppers adı verilen ve ekim sırasında 96'lık kuyunun tamamında aynı orta noktanın boş kalmasını sağlayan bariyerlerle birlikte gelen özel bir plaka bulunmaktadır. Kit içerisinde bulunan Oris™ Stoper Tool adlı özel bir tarakla bariyerler dikilip kaldırıldıktan sonra her kuyuda hücrelerin göç edebileceği eşit bir alan oluşur (Hulkower ve Herber, 2011).

Bu deney için öncelikle HaCaT hücreleri, 5x10^4 yoğunlukta, bariyer içeren 96-kuyucuklu özel plakaya ekilmiştir. Plakalar, 24 saat hücrelerin yapışması için inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda bariyerler tarak yardımıyla hücrelerden alınmış ve mevcut besiyeri, 10 ve 100 µg.mL^{-1} VAP, 10 µg.mL^{-1} VAP içeren NP-3, NP-6 ve NP-7 ve çözücü kontrolünü içeren 100 µl besiyeri içerisinde 24 saat inkübasyona maruz kalmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda, konsantrasyon gruplarını içeren besiyerleri uzaklaştırılmış ve yara çapı değişimi analizi için Leica DM 300 ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir (x4). Sonrasında hücreler immünofloresan boya (Hoechst 33258) ile işaretlendikten sonra floresans absorbsiyonu Cytation 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader kullanılarak ölçülmüş ve grafiklendirilmiştir (Kaya-Tilki vd., 2016). Aynı işlemler 24 saat inkübasyon

sonrasında da tekrarlanmıştır. Deney bitiminde, görüntüler üzerinde Leica LAS Image Analysis Programme ile yara çapı ölçümü gerçekleştirilmiş ve grafiklendirilmiştir.

4.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler ve grafiklerin çizilmesi için GraphPad Prism 6.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ile post-hoc olarak Tukey testi uygulanarak analiz edilmiştir. Anlamlılık değerleri; $p>0.05$ fark yok, $p<0.05$*, $p<0.01$**, $p<0.001$*** ve $p<0.0001$**** olarak değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR

5.1. Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları

5.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması

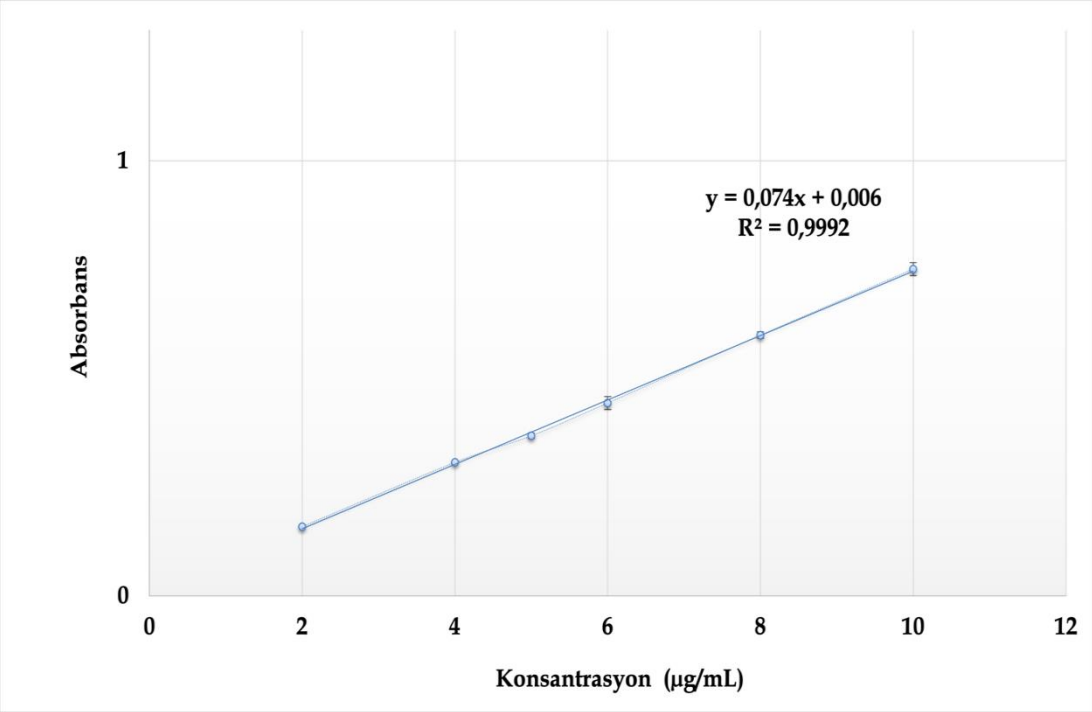
5.1.1.1. *Doğrusallık*

2-10 µg.mL^{-1} VAP konsantrasyonu aralığında altı farklı kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV ile analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri Tablo 5.1'de sunulmuştur. Absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğru denklemi Şekil 5.1'de sunulmuştur.

Tablo 5.1. *Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler*

VAP (µg/mL)	Absorbans Değerleri			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
2	0.151	0.164	0.162	0.159
4	0.311	0.306	0.303	0.307
5	0.352	0.383	0.369	0.368

6	0.419	0.486	0.425	0.443
8	0.578	0.611	0.609	0.599
10	0.722	0.791	0.740	0.751



Şekil 5.1. *VAP'ın 1:1 etanol: aseton ortamında standart eğrisi*

5.1.1.2. *Kesinlik*

VAP'ın 4, 6, 10 µg.mL^{-1} derişimde 3 farklı bir şekilde çözelti hazırlanmıştır. Her bir derişim için 3 tekrar analizi, 3 artarda gün yapılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar doğrusallık çalışmasından elde edilen denklem yardımıyla hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik için kabul edilebilir sınır varyasyon katsayısının (RSD) %2'den düşük olmasıdır. Kesinlik çalışması sonuçları Tablo 5.2., Tablo 5.3. ve Tablo 5.4.'te sunulmuştur. Bulguların kabul edilebilir sınır içinde olması yöntemin kesinliği kanıtlamaktadır.

Tablo 5.2. *4 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları*

4 µg.mL^{-1}			
	1. Gün (Absorbans)	**2. Gün (Absorbans)**	**3. gün (Absorbans)**
	0.311	0.308	0.306
	0.304	0.304	0.301
	0.303	0.301	0.300
	1. Gün (Derişim)	**2. Gün (Derişim)**	**3. gün (Derişim)**
	4.1195	4.0790	4.0520
	4.0250	4.0250	3.9844
	4.0114	3.9844	3.9709
Ortalama	4.0520	4.0295	4.0024
Standart sapma	0.0589	0.0474	0.0434
Varyasyon Katsayısı	1.4530	1.1772	1.0848
%95 Güven Aralığı	0.1463	0.1178	0.1079

Tablo 5.3. *6 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları*

6 µg.mL^{-1}			
	1. Gün (Absorbans)	**2. Gün (Absorbans)**	**3. gün (Absorbans)**
	0.451	0.447	0.456
	0.450	0.450	0.449
	0.449	0.454	0.448
	1. Gün (Derişim)	**2. Gün (Derişim)**	**3. gün (Derişim)**
	6.0104	5.9564	6.0780
	5.9969	5.9969	5.9834
	5.9834	6.0509	5.9699
Ortalama	5.9969	6.0014	6.0104
Standart sapma	0.0135	0.0474	0.0589
Varyasyon Katsayısı	0.2252	0.7904	0.9795
%95 Güven Aralığı	0.0336	0.1178	0.1463

Tablo 5.4. *10 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları*

10 µg.mL^{-1}			
	1. Gün (Absorbans)	**2. Gün (Absorbans)**	**3. gün (Absorbans)**
	0.751	0.734	0.748
	0.743	0.741	0.757
	0.746	0.749	0.734
	1. Gün (Derişim)	**2. Gün (Derişim)**	**3. gün (Derişim)**
	10.0624	9.8328	10.0219
	9.9543	9.9273	10.1434
	9.9949	10.0354	9.8328
Ortalama	10.0039	9.9318	9.9994
Standart sapma	0.0546	0.1014	0.1565
Varyasyon Katsayısı	0.5457	1.0207	1.5655
%95 Güven Aralığı	0.1356	0.2518	0.3889

5.1.1.3. *Doğruluk*

Doğruluğun belirlenebilmesi için 3 farklı derişimde (4 µg.mL^{-1}, 6 µg.mL^{-1}, 10 µg.mL^{-1}) VAP içeren stok çözeltiler hazırlanmış ve her bir derişim için 3 tekrar analizi

yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen denklem kullanılarak hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılmış ardından yöntemin doğruluğu '% geri kazanım' olarak hesaplanmıştır. Doğruluk çalışması için kabul edilebilir sınır % 98-102 (± %2) aralığıdır. Elde edilen sonuçlara göre yöntemin geri kazanım ve doğruluk için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.5.'de sunulmuştur.

Tablo 5.5. *VAP için elde edilen doğruluk değerleri*

	Eklenen Derişim		
	4 µg.mL^{-1}	**6 µg.mL^{-1}**	**10 µg.mL^{-1}**
Elde edilen absorbanslar	0.305	0.446	0.741
	0.301	0.454	0.745
	0.303	0.452	0.743
Bulunan Derişimler	4.0385	5.9429	9.9273
	3.9844	6.0509	9.9813
	4.0114	6.0239	9.9543
% Geri Kazanım	100.9615	99.0481	99.2732
	99.6109	100.8490	99.8135
	100.2862	100.3988	99.5433
Ortalama % Geri Kazanım	100.2862	100.0986	100.0986
Standart sapma	0.6753	0.9372	0.9372
Varyasyon Katsayısı	0.6734	0.9363	0.9363
%95 Güven Aralığı	1.6776	2.3281	2.3281

5.1.1.4. *Duyarlılık*

LOD ve LOQ değerleri '4.2.1.4. Duyarlılık' bölümünde söz edilen Denklem 4.1. ve Denkelm 4.2. kullanılarak hesaplanmış ve sırasıyla 0.3003 $\mu g.mL^{-1}$ ve 0.9101 $\mu g.mL^{-1}$ bulunmuştur.

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en küçük derişim 2 $\mu g.mL^{-1}$ olup hesaplanan LOD ve LOQ değerleri bu değerin çok altında bulunmuştur. Bu sonuçlar yöntemin duyarlılığını kanıtlamaktadır.

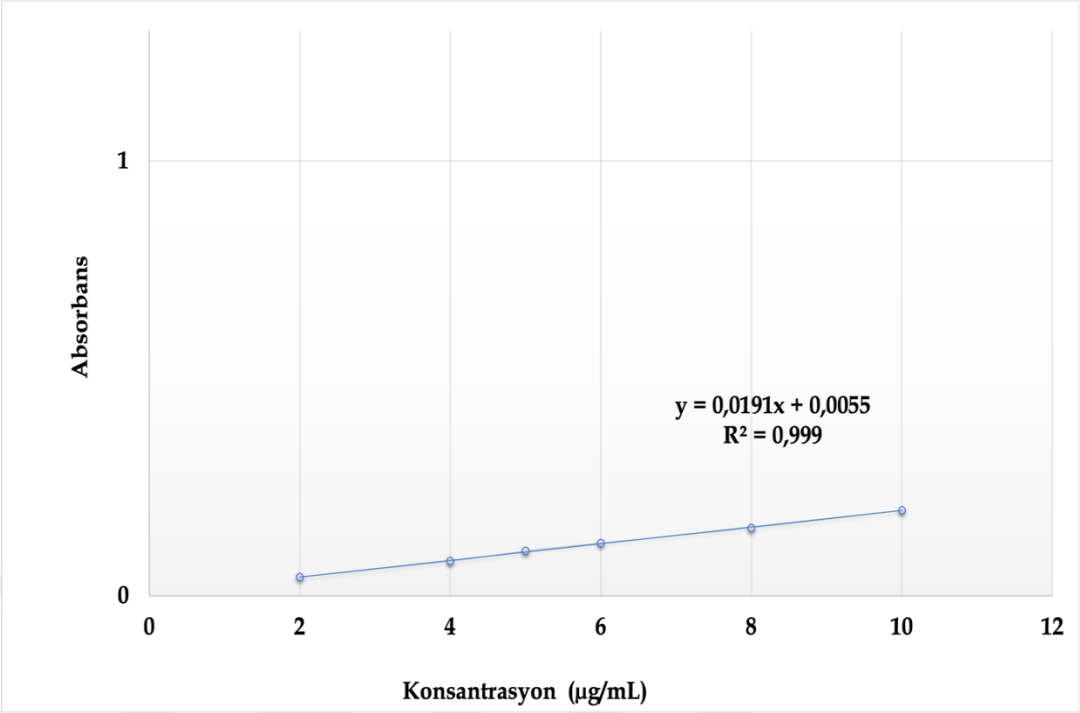
5.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması

5.1.2.1. *Doğrusallık*

2.-10 $\mu g.mL^{-1}$ VAP konsantrasyonu aralığında altı farklı kalibrasyon seti hazırlanmış ve ardından UV ile analiz edilmiştir. Konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri Tablo 5.6'da sunulmuştur. Absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve eğri ile eğriye ait doğru denklemi Şekil 5.2'de sunulmuştur.

Tablo 5.6. *Doğrusallık çalışması için hazırlanan seriler (n=6)*

VAP (µg/mL)	Absorbans Değerleri			
	1. Seri	2. Seri	3. Seri	Ortalama
2	0.034	0.049	0.047	0.043
4	0.079	0.084	0.077	0.080
5	0.098	0.108	0.104	0.103
6	0.118	0.127	0.120	0.122
8	0.151	0.161	0.157	0.156
10	0.197	0.200	0.193	0.197



Şekil 5.2. *VAP'ın %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında standart eğrisi*

5.1.2.2. *Kesinlik*

VAP'ın 4, 6, 10 µg.mL^{-1} derişimde 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Her bir derişim için 3 tekrar analizi, 3 artarda gün yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrusallık çalışmasında elde edilen denklem yardımıyla hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılarak yöntemin kesinliği incelenmiştir. Kesinlik için kabul edilebilir sınır varyasyon katsayısının (RSD) %2'den düşük olmasıdır. Kesinlik çalışması sonuçları Tablo 5.7., Tablo 5.8. ve Tablo 5.9.'da sunulmuştur. Bulguların kabul edilebilir sınır içinde olması yöntemin kesinliği kanıtlamaktadır.

Tablo 5.7. *4 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları*

4 µg.mL^{-1}			
	1. Gün (Absorbans)	**2. Gün (Absorbans)**	**3. gün (Absorbans)**
	0.083	0.082	0.083
	0.084	0.082	0.081
	0.082	0.081	0.082
	1. Gün (Derişim)	**2. Gün (Derişim)**	**3. gün (Derişim)**
	4.058	4.0058	4.0582
	4.111	4.0058	3.9535
	4.006	3.9535	4.0058
Ortalama	4.0582	3.9884	4.0058
Standart sapma	0.0524	0.0302	0.0524
Varyasyon Katsayısı	1.2907	0.7582	1.3076
%95 Güven Aralığı	0.1301	0.0751	0.1301

Tablo 5.8. *6 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları*

6 µg.mL^{-1}			
	1. Gün (Absorbans)	**2. Gün (Absorbans)**	**3. gün (Absorbans)**
	0.120	0.121	0.119
	0.121	0.123	0.122
	0.122	0.119	0.120
	1. Gün (Derişim)	**2. Gün (Derişim)**	**3. gün (Derişim)**
	5.9963	6.0487	5.9439
	6.0487	6.1534	6.1011
	6.1011	5.9439	5.9963
Ortalama	6.0487	6.0487	6.0138
Standart sapma	0.0524	0.1048	0.0800
Varyasyon Katsayısı	0.8660	1.7320	1.3305
%95 Güven Aralığı	0.1301	0.2602	0.1988

Tablo 5.9. *10 µg.mL^{-1} derişim için kesinlik sonuçları*

10 µg.mL^{-1}			
	1. Gün (Absorbans)	**2. Gün (Absorbans)**	**3. gün (Absorbans)**
	0.197	0.195	0.197
	0.196	0.198	0.200
	0.195	0.197	0.201
	1. Gün (Derişim)	**2. Gün (Derişim)**	**3. gün (Derişim)**
	10.0296	9.9248	10.0296
	9.9772	10.0820	10.1867
	9.9248	10.0296	10.2391
Ortalama	9.9772	10.0121	10.1518
Standart sapma	0.0524	0.0800	0.1090
Varyasyon Katsayısı	0.5250	0.7992	1.0741
%95 Güven Aralığı	0.1301	0.1988	0.2709

5.1.2.3. *Doğruluk*

Doğruluğun belirlenebilmesi için 3 farklı derişimde (4 µg.mL^{-1}, 6 µg.mL^{-1}, 10 µg.mL^{-1}) vitamin A palmitat içeren stok çözeltiler hazırlanmış ve her biri için 3 kez tekrar analizi yapılmıştır. Ortaya çıkan sonuçlar doğrusallık çalışmasından elde edilen denklem kullanılarak hesaplanmış ve bilinen derişimler ile karşılaştırılmış ardından yöntemin doğruluğu '% geri kazanım' olarak hesaplanmıştır. Doğruluk çalışması için kabul edilen sınır %98-102 (± %2) aralığıdır. Elde edilen sonuçlara göre yöntemin geri kazanım ve doğruluk için uygun olduğu kanıtlanmıştır. Sonuçlar Tablo 5.10.'da sunulmuştur.

Tablo 5.10. *VAP için elde edilen doğruluk değerleri*

Eklenen Derişim			
	4 µg.mL^{-1}	**6 µg.mL^{-1}**	**10 µg.mL^{-1}**
Elde edilen absorbanslar	0.084	0.122	0.196
	0.082	0.119	0.197
	0.083	0.121	0.201
Bulunan Derişimler	4.1106	6.1011	9.9772
	4.0058	5.9439	10.0296
	4.0582	6.0487	10.2391
% Geri Kazanım	102.7651	101.6842	99.7719
	100.1461	99.0652	100.2958
	101.4556	100.8112	102.3910
Ortalama % Geri Kazanım	101.4556	100.5202	100.8196
Standart sapma	1.3095	1.3335	1.3859
Varyasyon Katsayısı	1.2907	1.3266	1.3746
%95 Güven Aralığı	3.2530	3.3127	3.4426

5.1.2.4. *Duyarlılık*

LOD ve LOQ değerleri ‘4.2.1.4. Duyarlılık’ bölümünde söz Denklem 4.1. ve Denklem 4.2. kullanılarak hesaplanmış ve sırasıyla 0.3406 $\mu g.mL^{-1}$ ve 1.0321 $\mu g.mL^{-1}$ bulunmuştur.

Yöntemin duyarlılığı için kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte ölçülebilen en küçük derişim 2 $\mu g.mL^{-1}$ olup hesaplanan LOD ve LOQ değerleri bu değerin altında bulunmuştur. Bu sonuçlar yöntemin duyarlılığını kanıtlamaktadır.

5.2. Çalışma Koşulunda Kararlılık

5.2.1. Formülasyon hazırlama koşulunda kararlılık

Formülasyon hazırlama koşullarında kararlılık çalışması sonuçları Tablo 5.11.’de sunulmuştur.

5.2.2. Enkapsülasyon etkinliği tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık

Enkapsülasyon etkinliği tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık çalışması sonuçları Tablo 5.11.’de sunulmuştur.

5.2.3. *In vitro* dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık

In vitro dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık çalışması sonuçları Tablo 5.11.’de sunulmuştur.

Tablo 5.11. *Çalışma koşullarında kararlılık sonuçları*

	Kararlılığın incelendiği ortam	**% Geri kazanım (Ortalama± Standart sapma)**
Formülasyon hazırlama koşulunda kararlılık	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 çözeltisi	99.02 ± 0.74
	10 mL, %0.2'lik kitosan çözeltisi	98.64 ± 1.04
	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.2'lik kitosan çözeltisi	99.71 ± 0.03
	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.1'lik kitosan çözeltisi	99.16 ± 0.80
	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.05'lik kitosan çözeltisi	98.19 ± 1.18
	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.025'lik kitosan çözeltisi	98. 02 ± 1.62
	10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.0125'lik kitosan çözeltisi	99.21 ± 0.53
Enkapsülasyon etkinliği tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık	etanol:aseton (1:1) karışımı	98.82 ± 0.95
***In vitro* dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık**	%1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8	98.96 ± 1.03

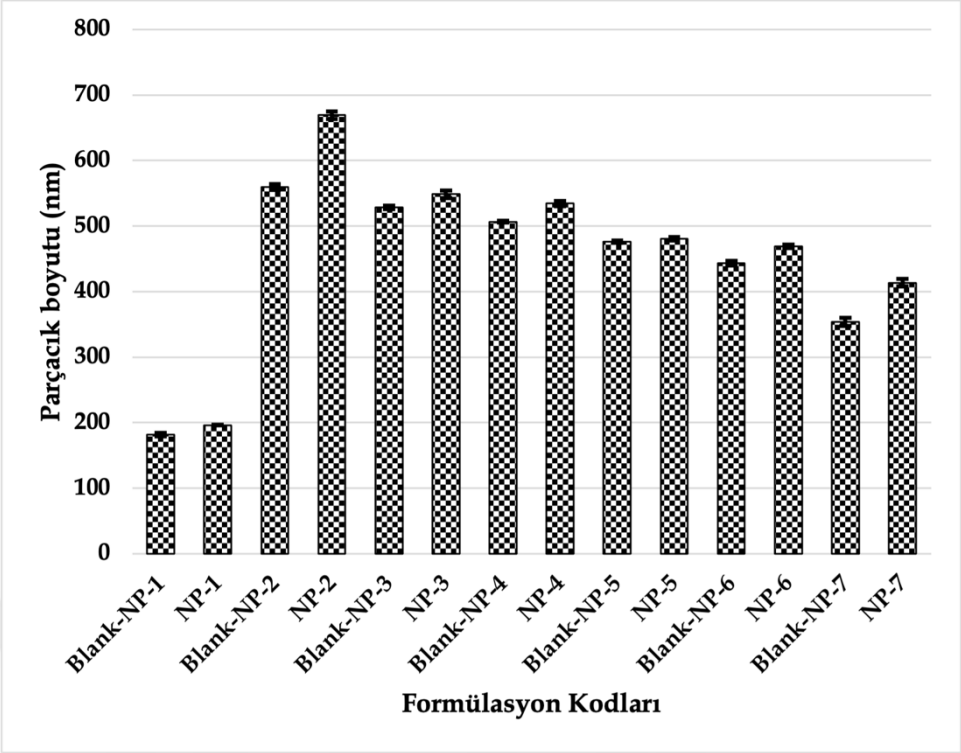
5.3. Vitamin A Palmitat Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

5.3.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı

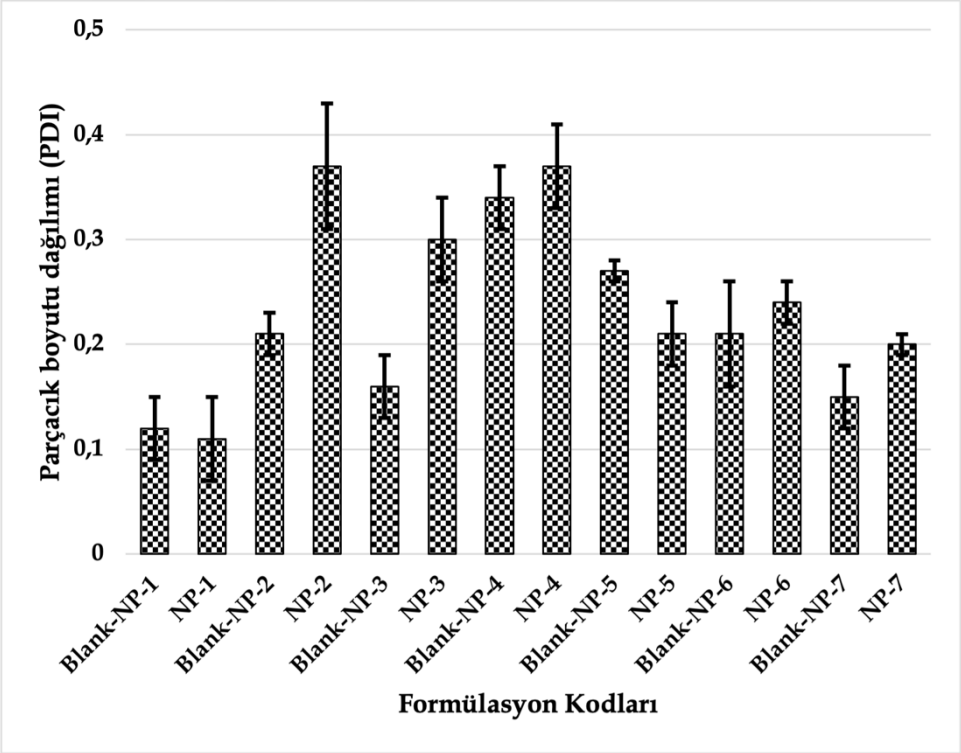
Tablo 5.12.'de hazırlanan tüm formülasyonların parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımları verilmiştir. Verilerin daha net anlaşılabilmesi için Şekil 5.3. ve Şekil 5.4.'te sırasıyla parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı verileri grafik olarak sunulmuştur. Zetasizer Nano ZS cihazından alınan otomatik parçacık boyut dağılım raporları ise Blank-NP-1, NP-1, Blank-NP-2, NP-2, Blank-NP-3, NP-3, Blank-NP-4, NP-4, Blank-NP-5, NP-5, Blank-NP-6, NP-6, Blank-NP-7 ve NP-7 için sırasıyla Şekil 5.5., Şekil 5.6., Şekil 5.7., Şekil 5.8., Şekil 5.9., Şekil 5.10., Şekil 5.11., Şekil 5.12., Şekil 5.13., Şekil 5.14., Şekil 5.15., Şekil 5.16., Şekil 5.17. ve Şekil 5.18.'de sunulmuştur.

Tablo 5.12. *Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı sonuçları*

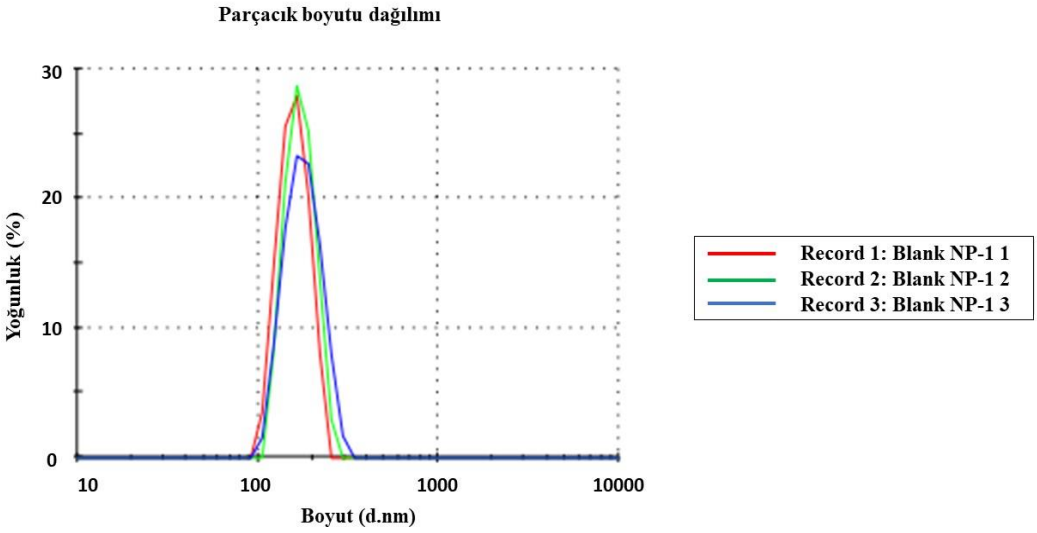
Kod	Parçacık Boyutu (nanometre, ortalama±standart sapma)	Parçacık Boyutu Dağılımı (PDI, ortalama±standart sapma)
Blank-NP-1	181.77 ± 2.38	0.12 ± 0.03
NP-1	196.33 ± 0.65	0.11 ± 0.04
Blank-NP-2	559.63 ± 4.08	0.21 ± 0.02
NP-2	669.23 ± 5.49	0.37 ± 0.06
Blank-NP-3	528.63 ± 2.50	0.16 ± 0.03
NP-3	548.43 ± 5.94	0.30 ± 0.04
Blank-NP-4	506.70 ± 1.56	0.34 ± 0.03
NP-4	534.50 ± 3.78	0.37 ± 0.04
Blank-NP-5	475.97 ± 1.87	0.27 ± 0.01
NP-5	480.87 ± 2.70	0.21 ± 0.03
Blank-NP-6	443.40 ± 3.70	0.21 ± 0.05
NP-6	469.07 ± 2.37	0.24 ± 0.02
Blank-NP-7	353.90 ± 6.37	0.15 ± 0.03
NP-7	413.60 ± 5.77	0.20 ± 0.01



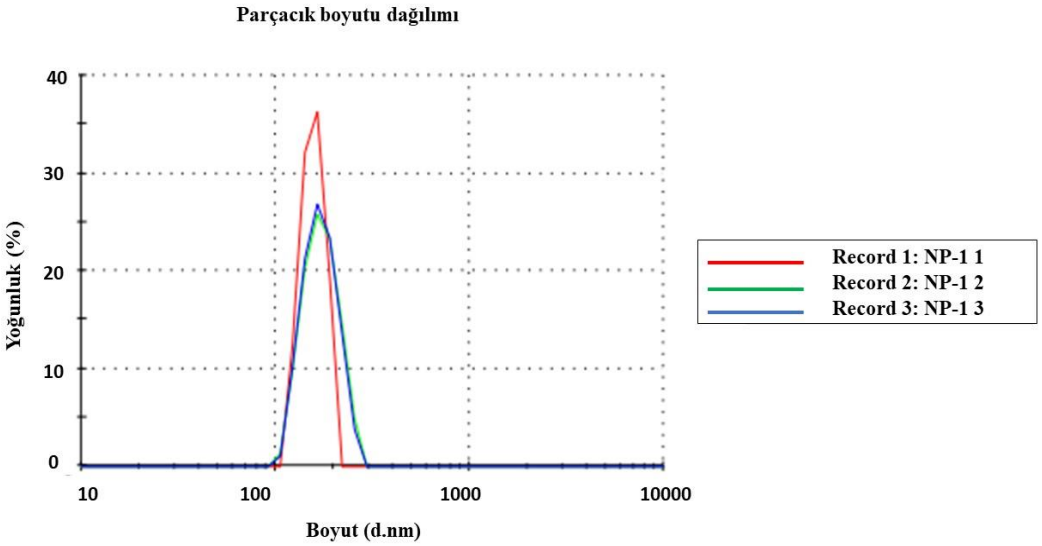
Şekil 5.3. *Hazırlanan formülasyonların parçacık boyut sonuçları grafiği*



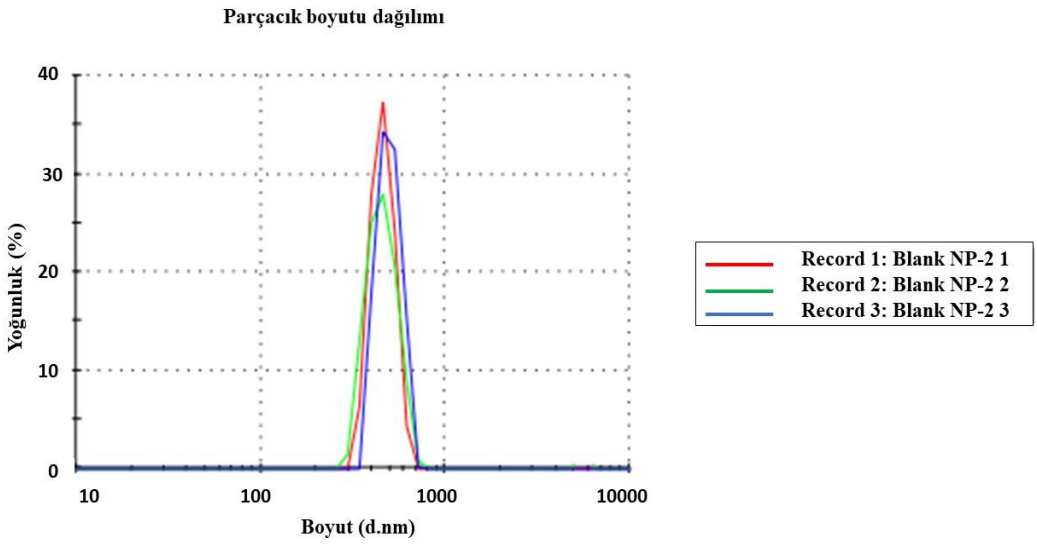
Şekil 5.4. *Hazırlanan formülasyonların parçacık boyutu dağılımı sonuçları grafiği*



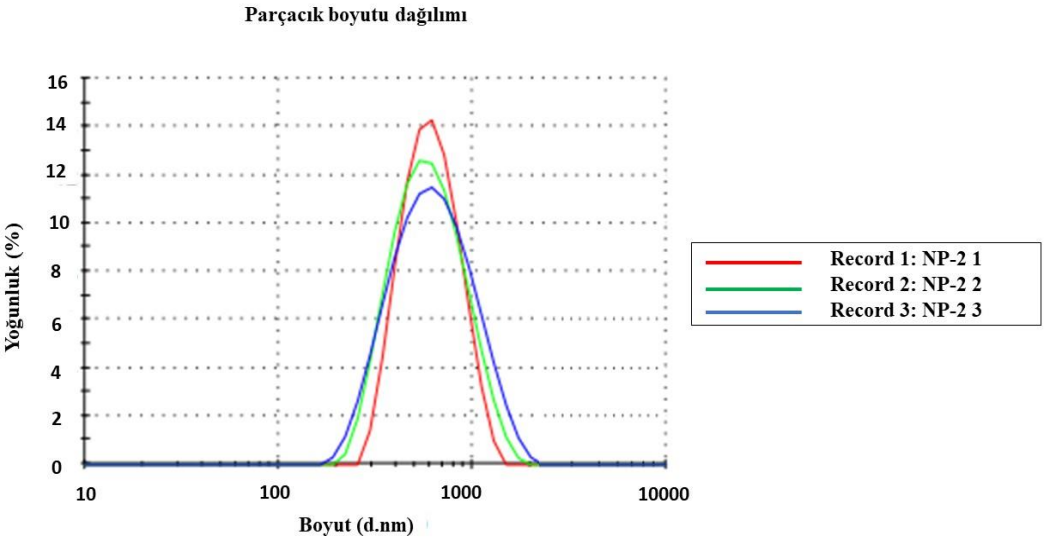
Şekil 5.5. *Blank-NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



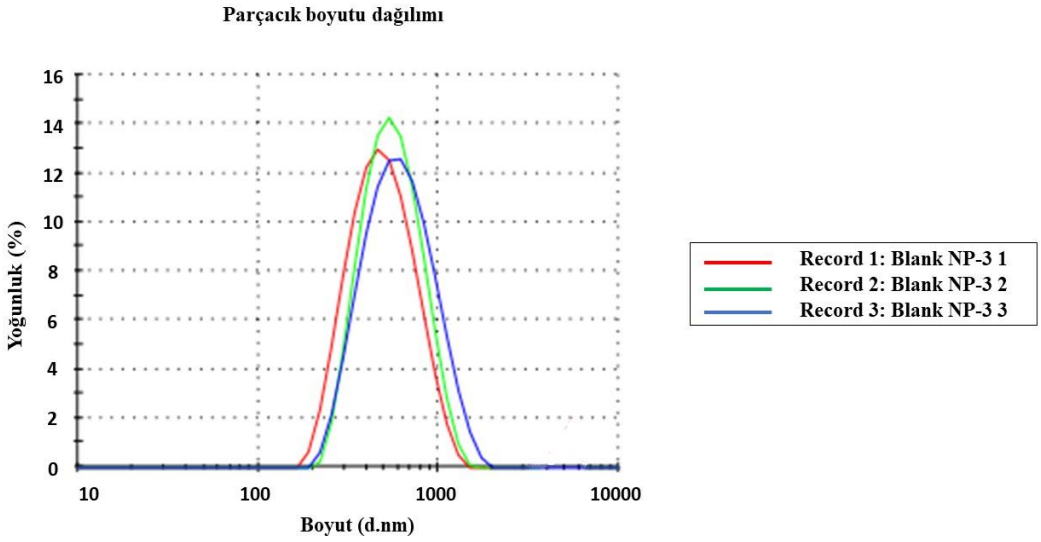
Şekil 5.6. *NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



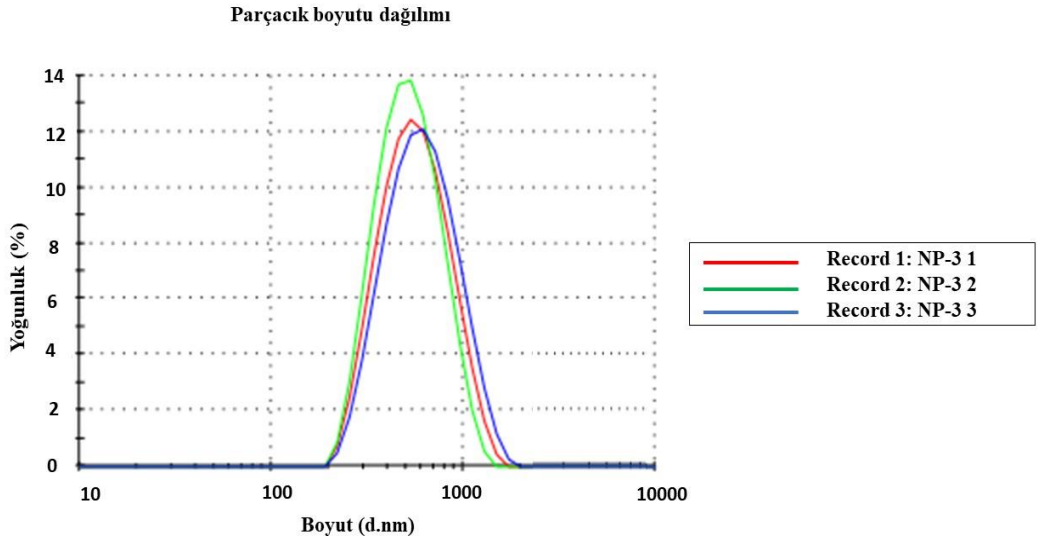
Şekil 5.7. *Blank-NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



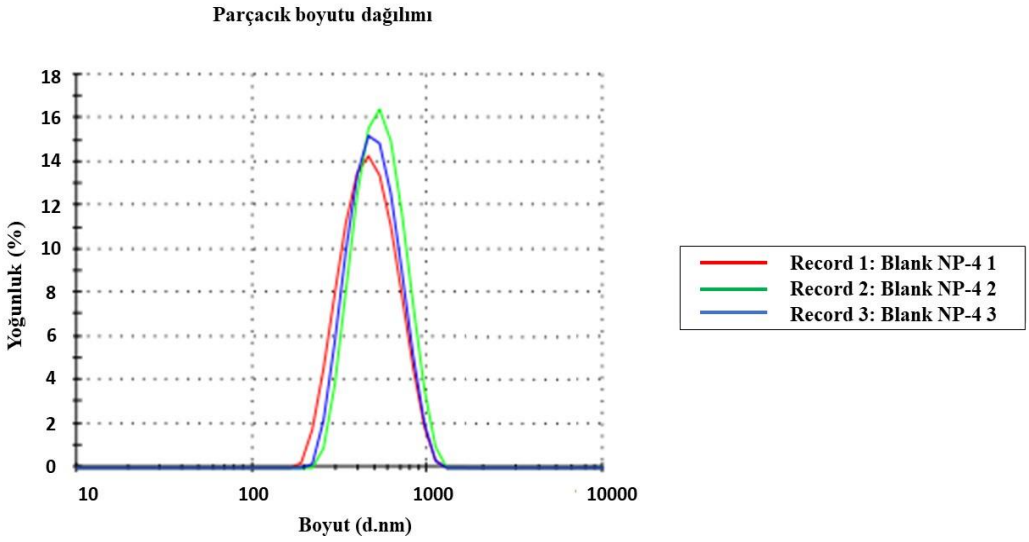
Şekil 5.8. *NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



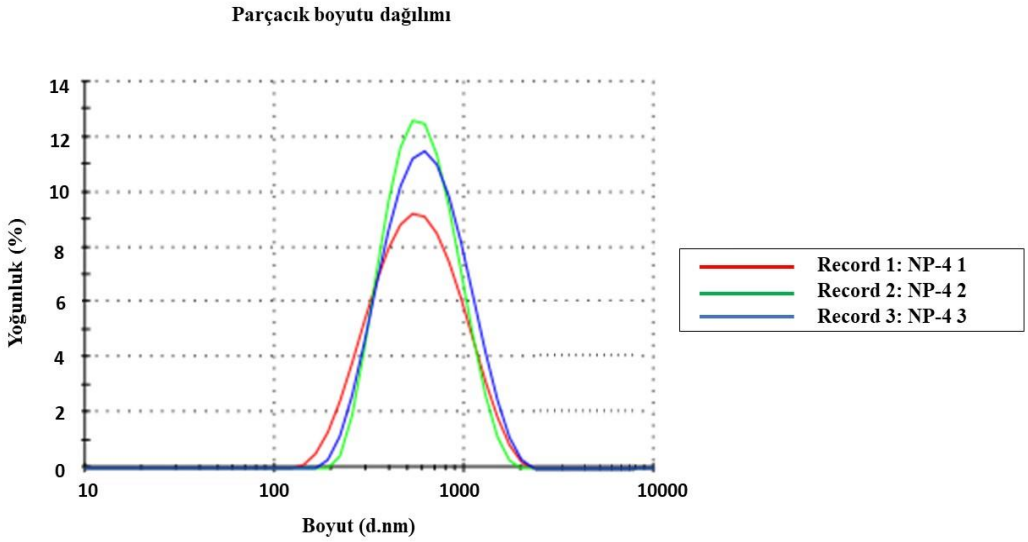
Şekil 5.9. *Blank-NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



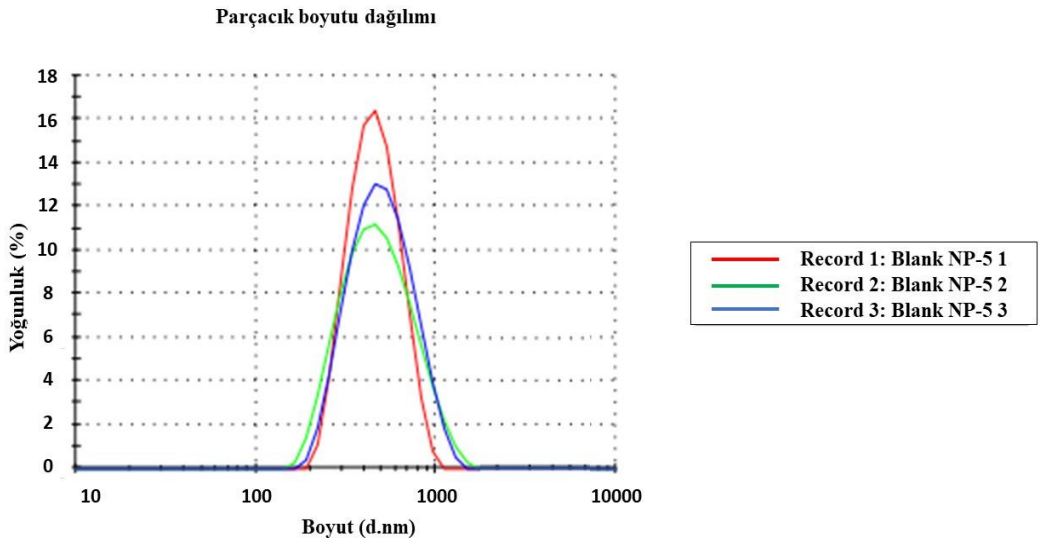
Şekil 5.10. *NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



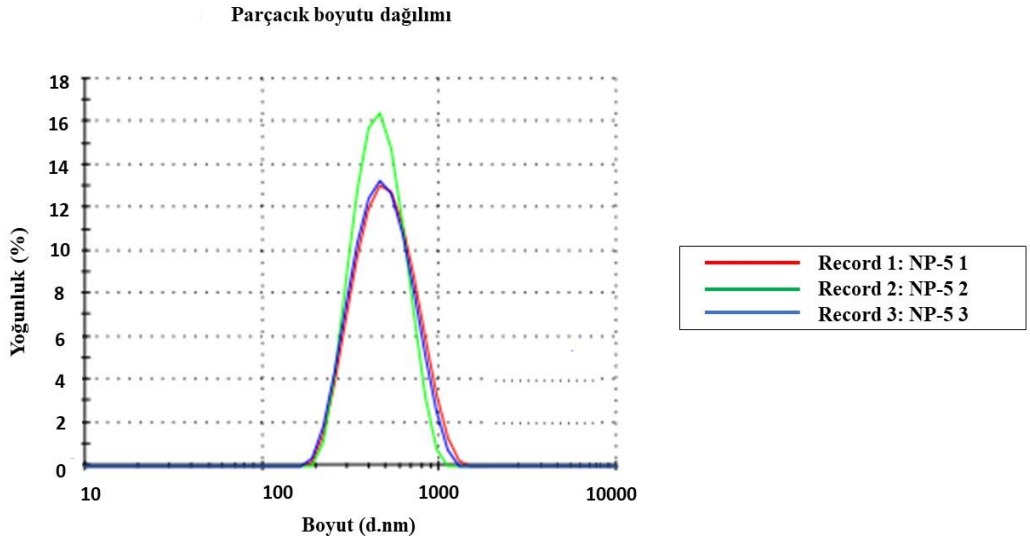
Şekil 5.11. *Blank-NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



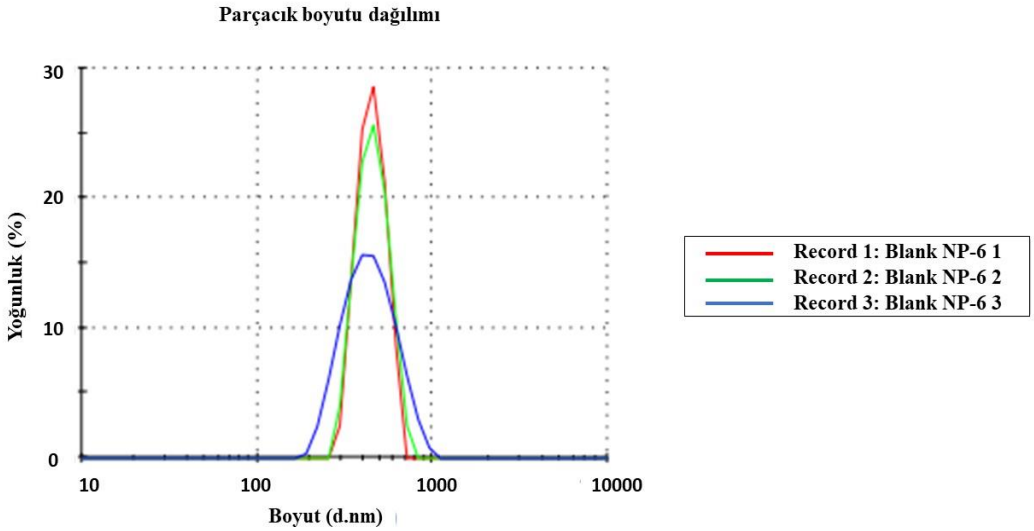
Şekil 5.12. *NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



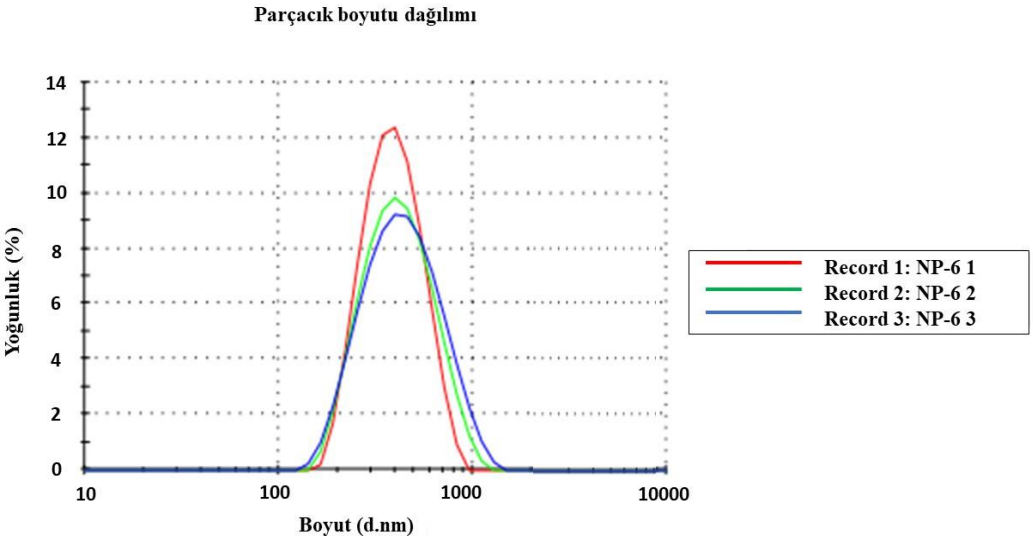
Şekil 5.13. *Blank-NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



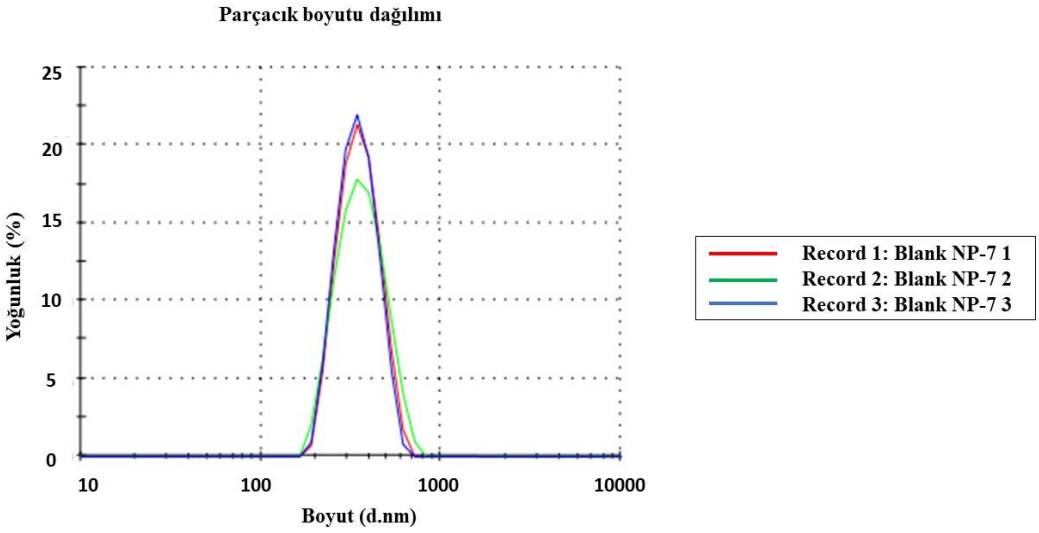
Şekil 5.14. *NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



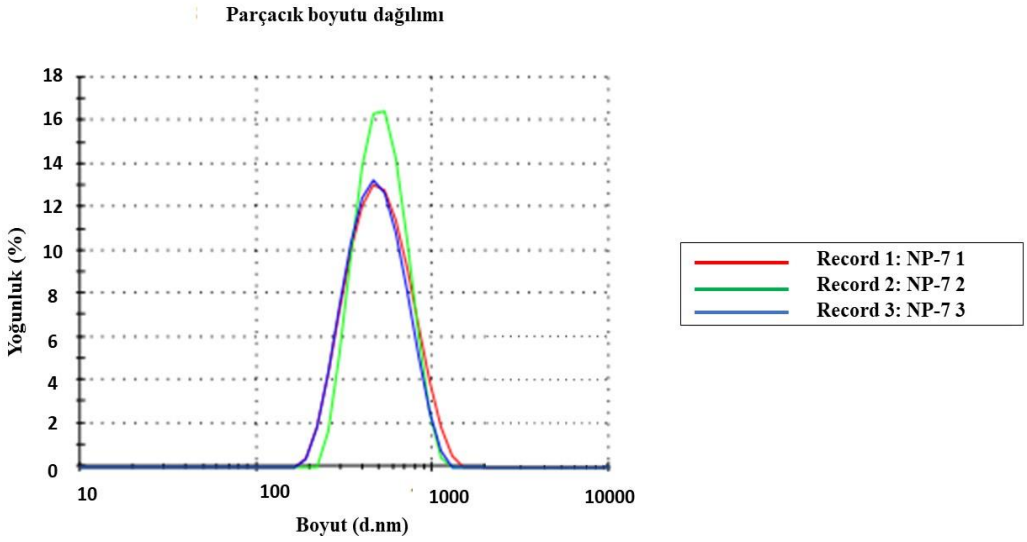
Şekil 5.15. *Blank-NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



Şekil 5.16. *NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



Şekil 5.17. *Blank-NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*



Şekil 5.18. *NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan parçacık boyut dağılım raporu*

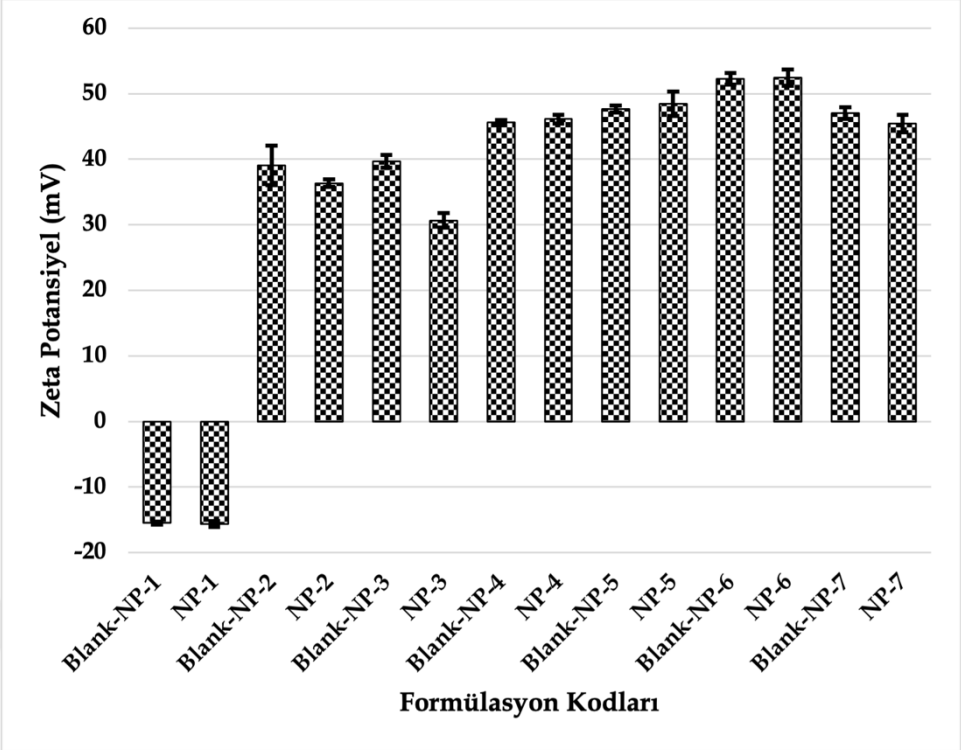
5.3.2. Zeta potansiyel

Tablo 5.13.'de hazırlanan tüm formülasyonların zeta potansiyel analiz sonuçları verilmiştir. Verilerin daha net anlaşılabilmesi için Şekil 5.19.'da zeta potansiyel verileri grafik olarak sunulmuştur. Zetasizer Nano ZS cihazından alınan otomatik zeta potansiyel sonuç raporları ise Blank-NP-1, NP-1, Blank-NP-2, NP-2, Blank-NP-3, NP-3, Blank-NP-

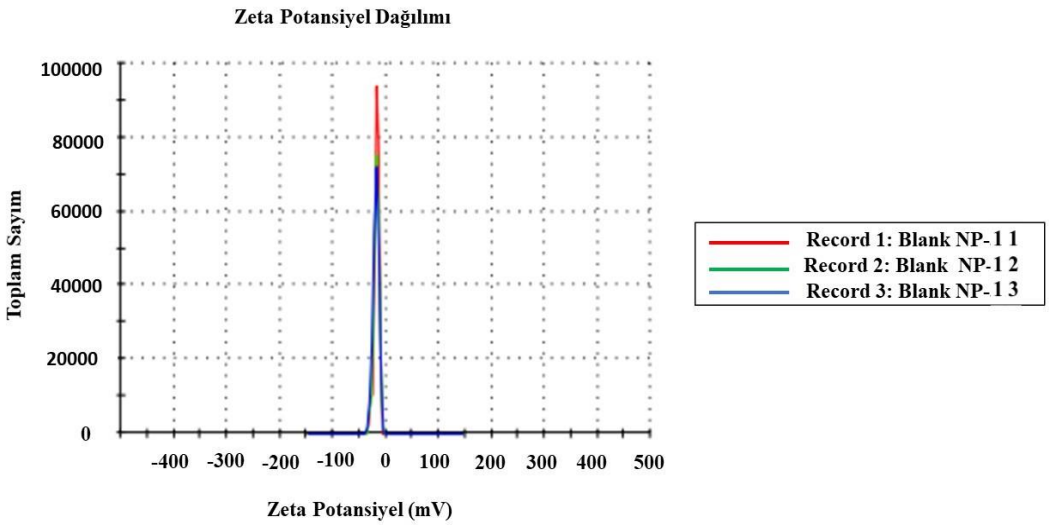
4, NP-4, Blank-NP-5, NP-5, Blank-NP-6, NP-6, Blank-NP-7 ve NP-7 için sırasıyla Şekil 5.20., Şekil 5.21, Şekil 5.22., Şekil 5.23., Şekil 5.24., Şekil 5.25., Şekil 5.26., Şekil 5.27., Şekil 5.28., Şekil 5.29., Şekil 5.30., Şekil 5.31., Şekil 5.32. ve Şekil 5.33.'te sunulmuştur.

Tablo 5.13. *Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel sonuçları*

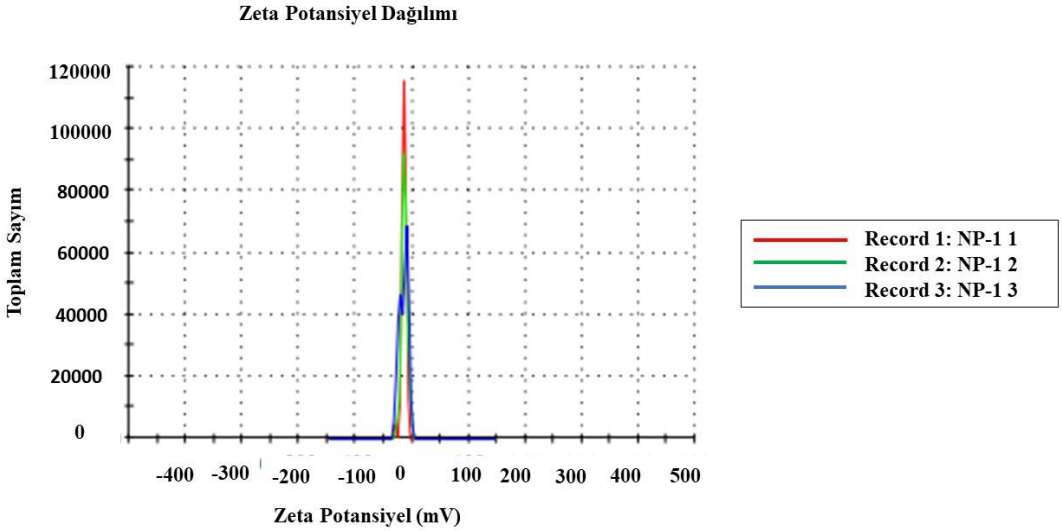
Kod	**Zeta potansiyel (mV, ortalama±standart sapma)**
Blank-NP-1	- 15.47 ± 0.23
NP-1	-15.60 ± 0.44
Blank-NP-2	+39.07 ± 3.04
NP-2	+36.33 ± 0.57
Blank-NP-3	+39.67 ± 0.96
NP-3	+30.67 ± 1.10
Blank-NP-4	+45.63 ± 0.40
NP-4	+46.13 ± 0.70
Blank-NP-5	+47.67 ± 0.51
NP-5	+48.50 ±1.85
Blank-NP-6	+52.27 ± 0.9
NP-6	+52.47 ± 1.23
Blank-NP-7	+47.03 ± 0.87
NP-7	+45.43 ± 1.34



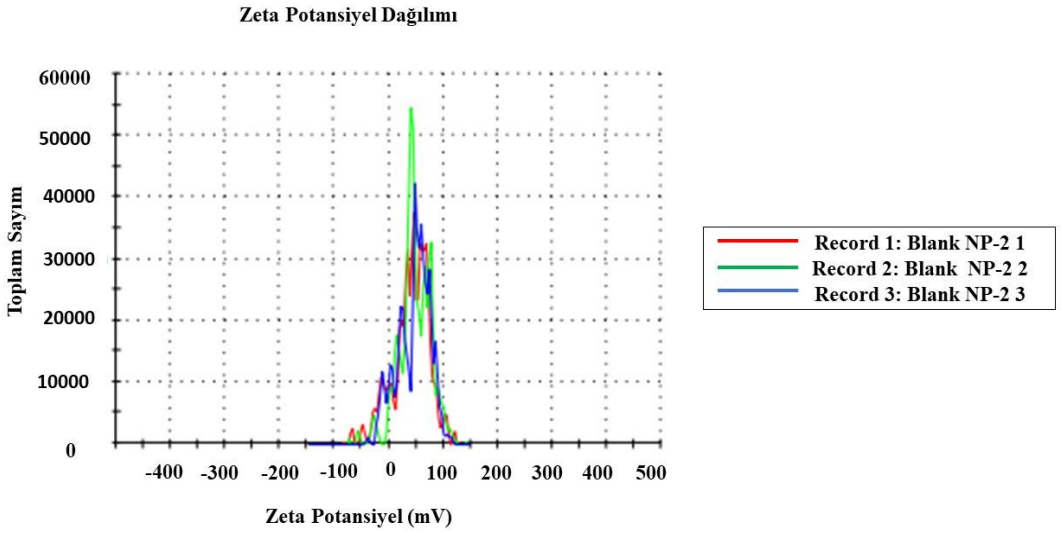
Şekil 5.19. *Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyel sonuçları grafiği*



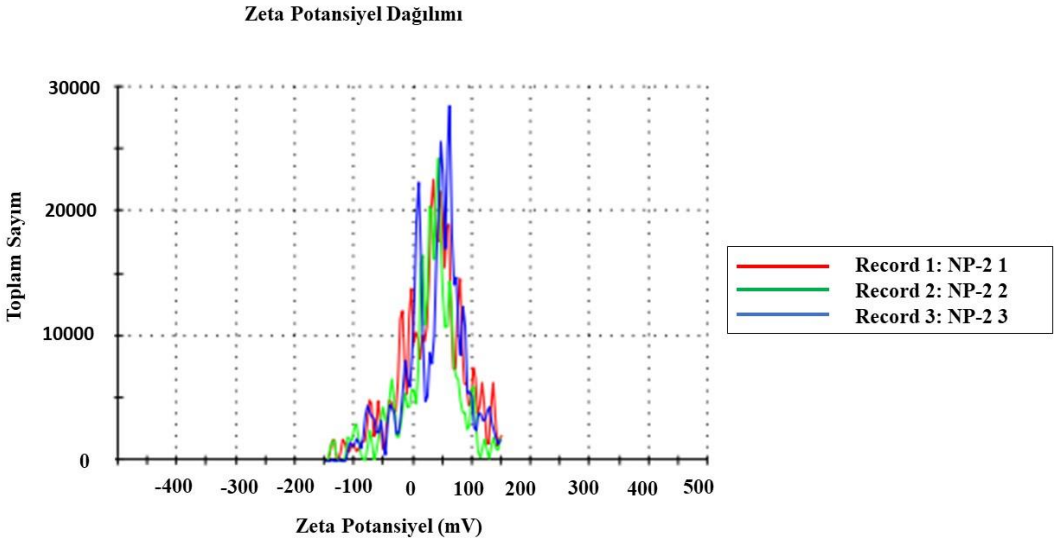
Şekil 5.20. *Blank-NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den zeta potansiyel raporu*



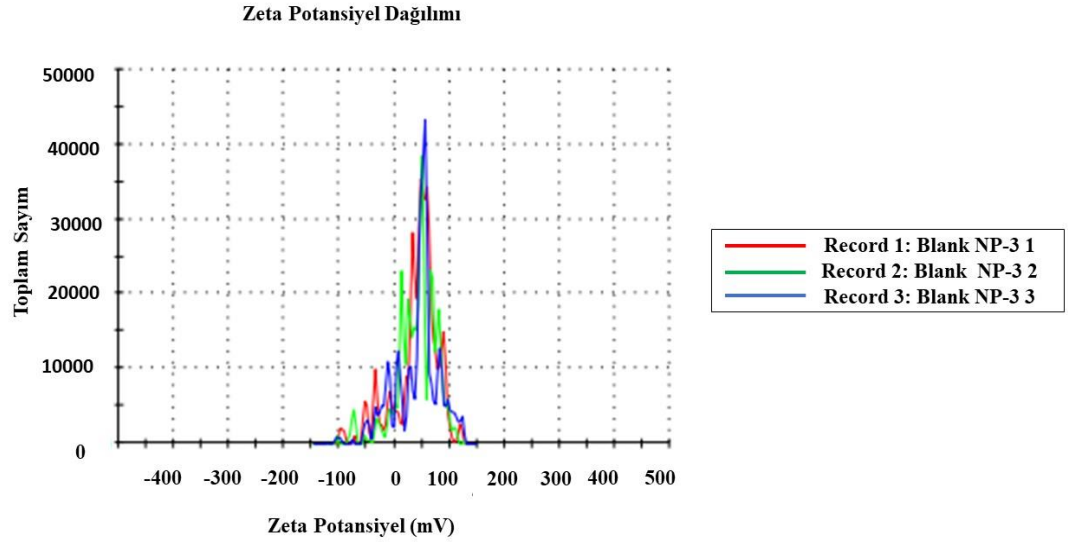
Şekil 5.21. *NP-1 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



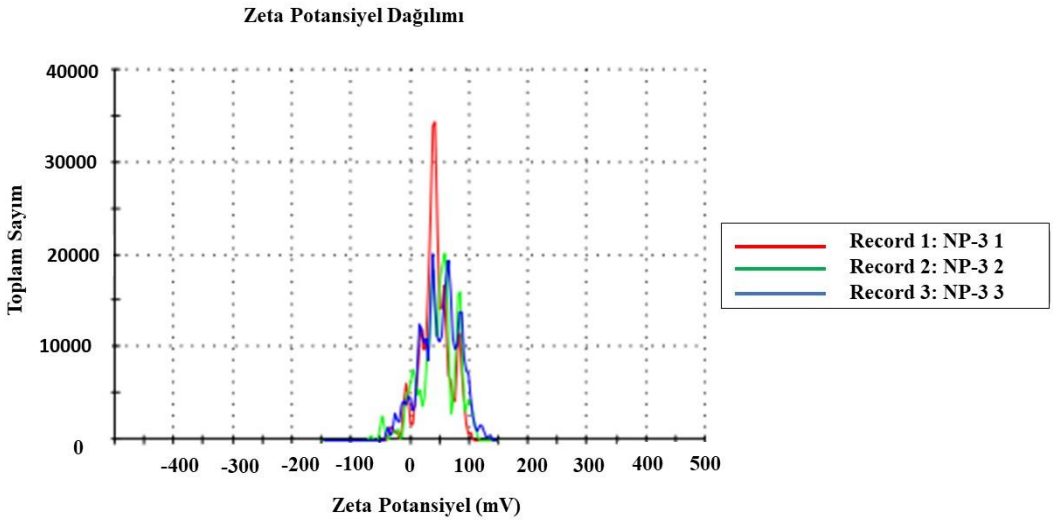
Şekil 5.22. *Blank-NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



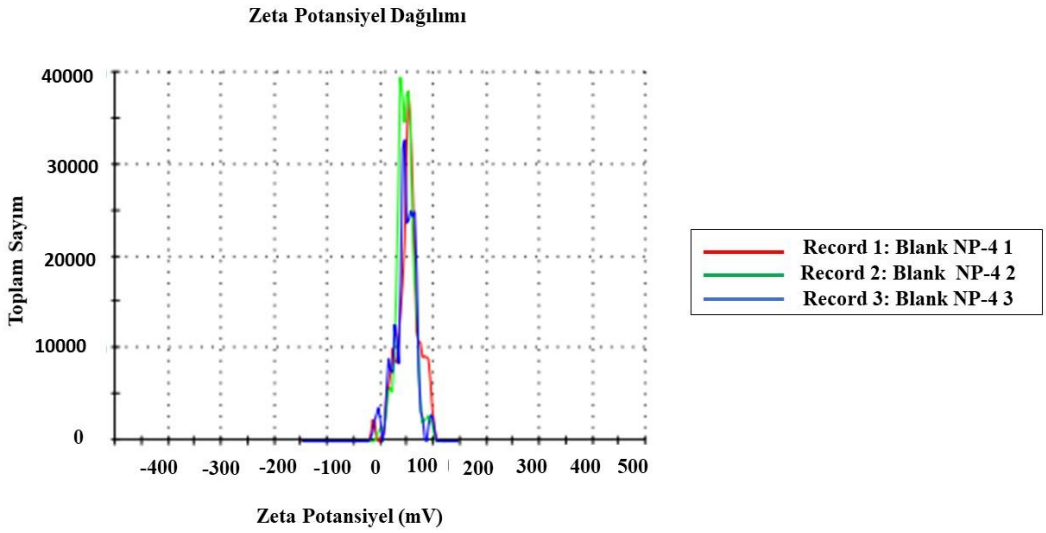
Şekil 5.23. *NP-2 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



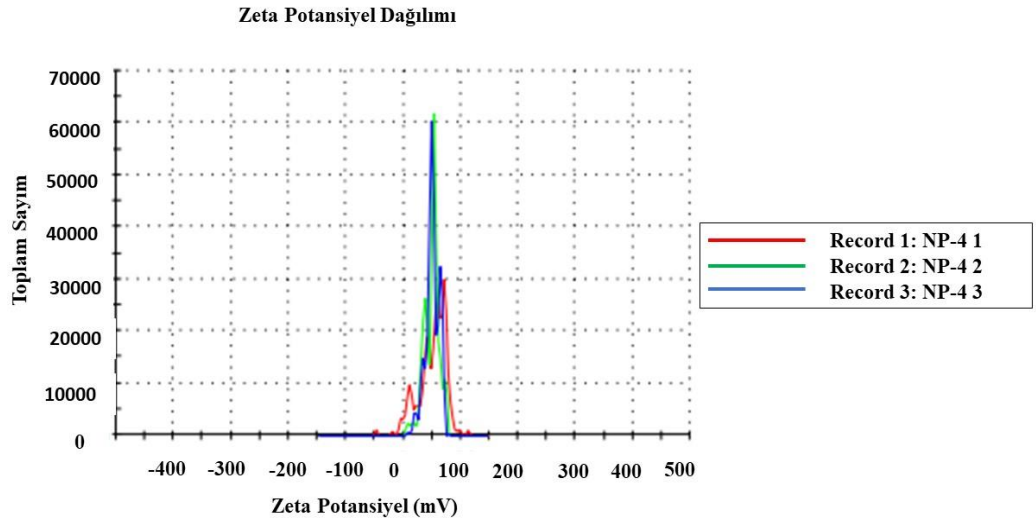
Şekil 5.24. *Blank-NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



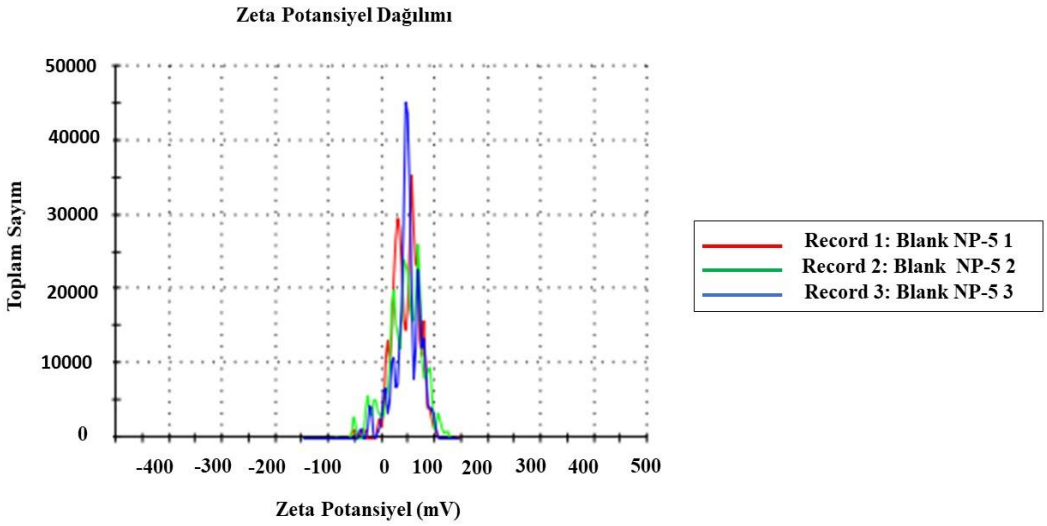
Şekil 5.25. *NP-3 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



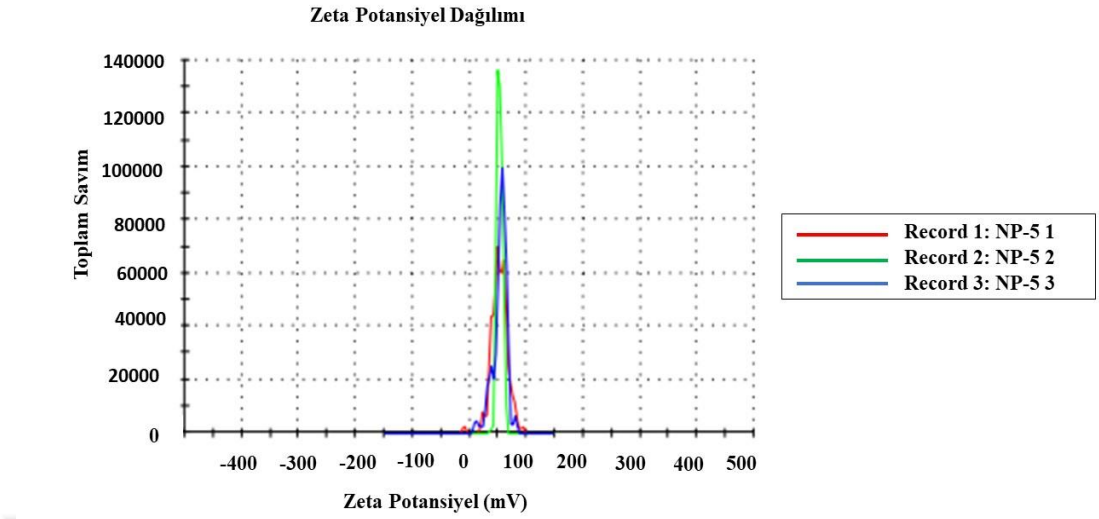
Şekil 5.26. *Blank-NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



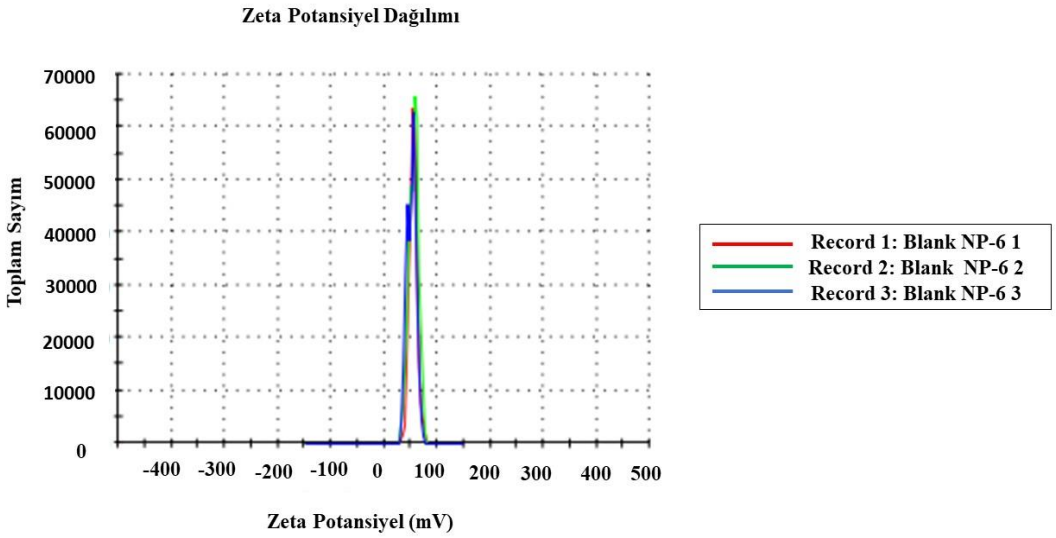
Şekil 5.27. *NP-4 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



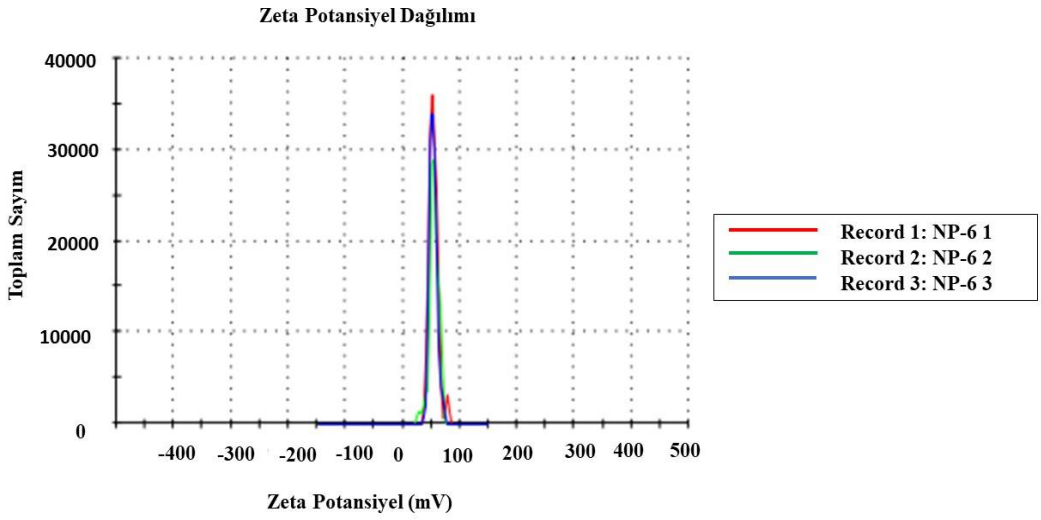
Şekil 5.28. *Blank-NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



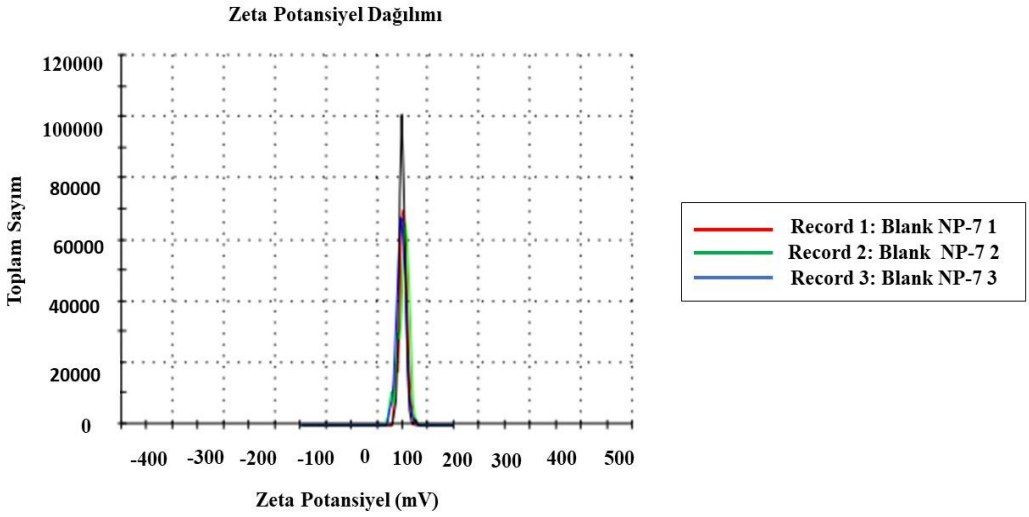
Şekil 5.29. *NP-5 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



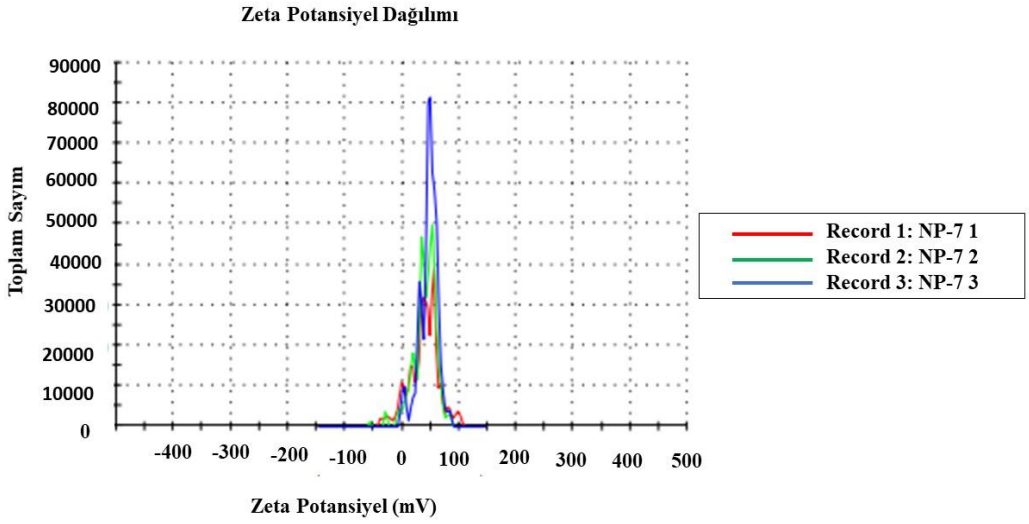
Şekil 5.30. *Blank-NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



Şekil 5.31. *NP-6 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



Şekil 5.32. *Blank-NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*



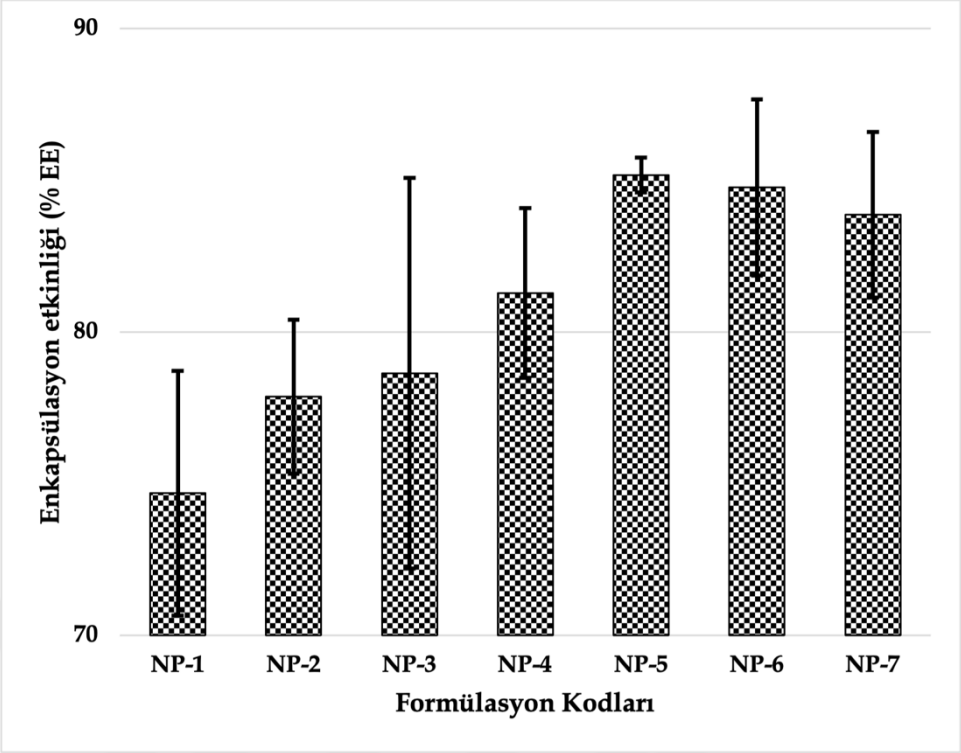
Şekil 5.33. *NP-7 kodlu formülasyon için Zetasizer Nano ZS'den alınan zeta potansiyel raporu*

5.3.3. Enkapsülasyon etkinliği

Tablo 5.14.'te hazırlanan VAP içeren formülasyonların enkapsülasyon etkinliği (% EE) analiz sonuçları verilmiştir. Verilerin daha net anlaşılabilmesi için Şekil 5.34.'te enkapsülasyon etkinliği verileri grafik olarak sunulmuştur.

Tablo 5.14. *Hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği sonuçları*

Kod	Enkapsülasyon etkinliği (%)
NP-1	74.69 ± 4.04
NP-2	77.86 ± 2.53
NP-3	78.64 ± 6.44
NP-4	81.28 ± 2.80
NP-5	85.18 ± 0.58
NP-6	84.78 ± 2.91
NP-7	83.87 ± 2.73



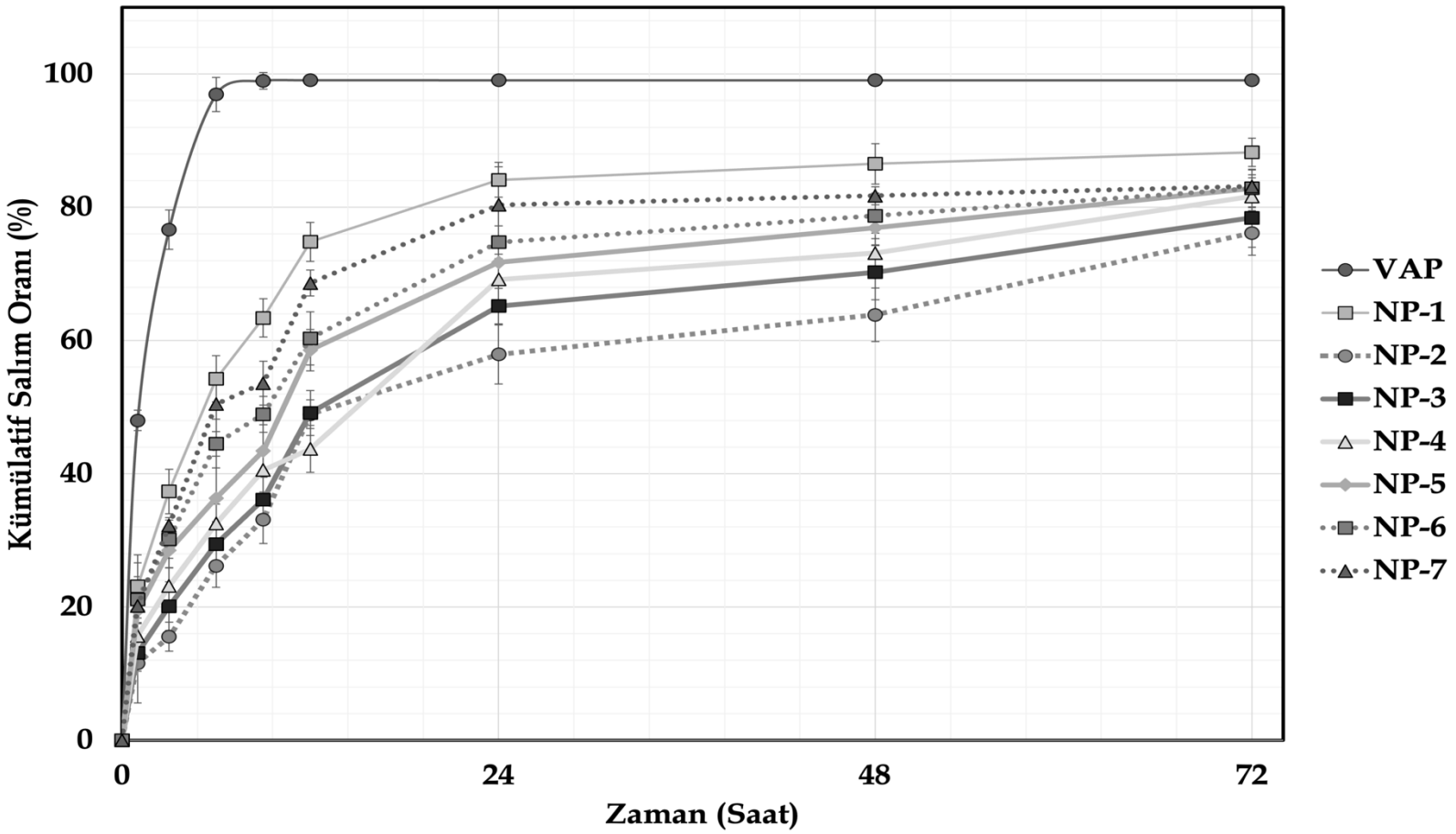
Şekil 5.34. *Hazırlanan formülasyonların enkapsülasyon etkinliği sonuçları grafiği*

5.3.4. *In vitro* dissolüsyon

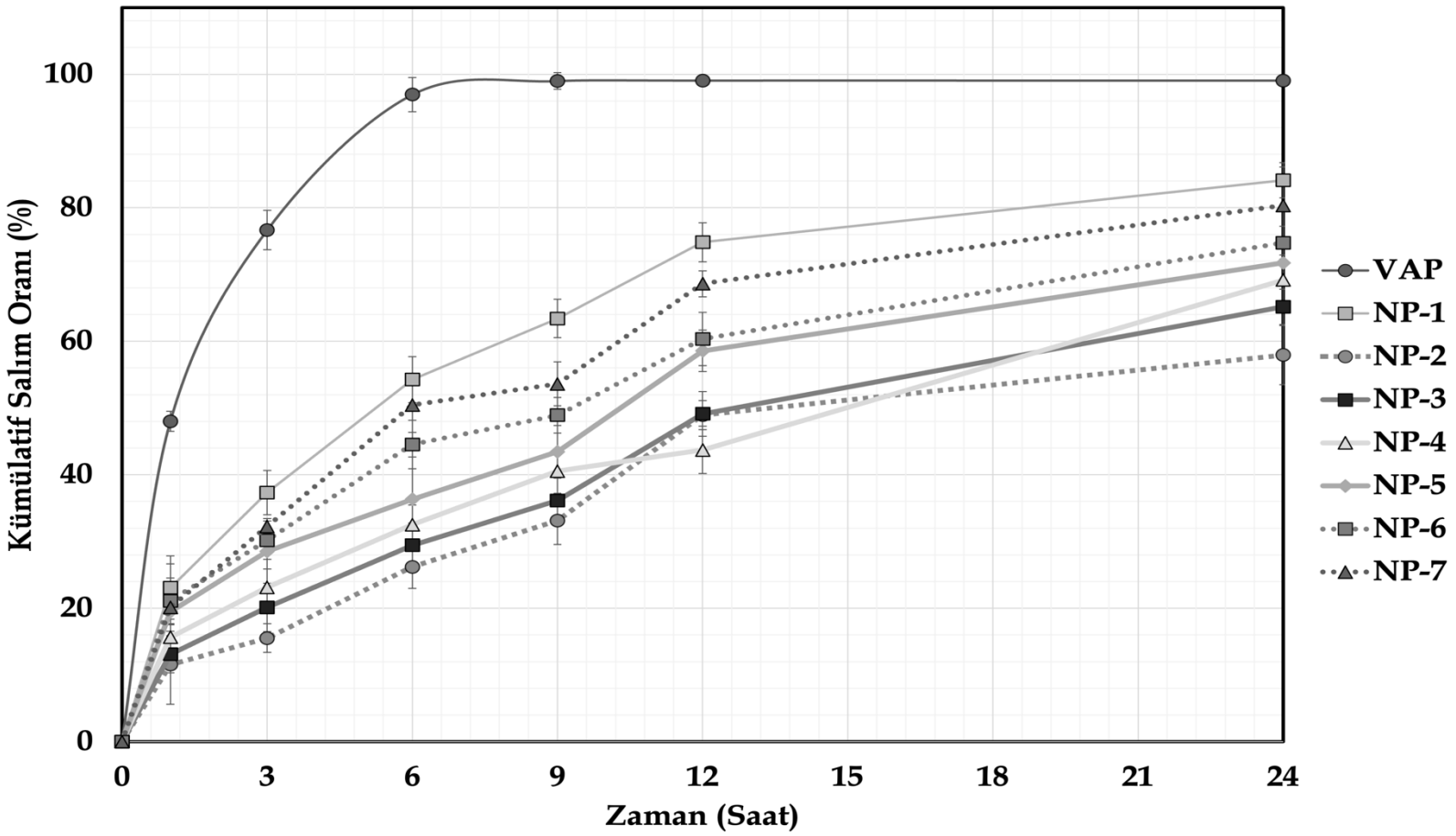
VAP, NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlara ait zamana karşı kümülatif çözünen etkin madde miktarı verileri Tablo 5.15.'de verilmiştir. Elde edilen tüm veriler kullanılarak VAP ve nanopartikül formülasyonlarına ait *in vitro* dissolüsyon profilleri 72 saatlik, 24 saatlik ve 12 saatlik olarak sırasıyla Şekil 5.35., Şekil 5.36. ve Şekil 5.37'de sunulmuştur.

Tablo 5.15. *Hazırlanan formülasyonların kümülatif dissolüsyon verileri*

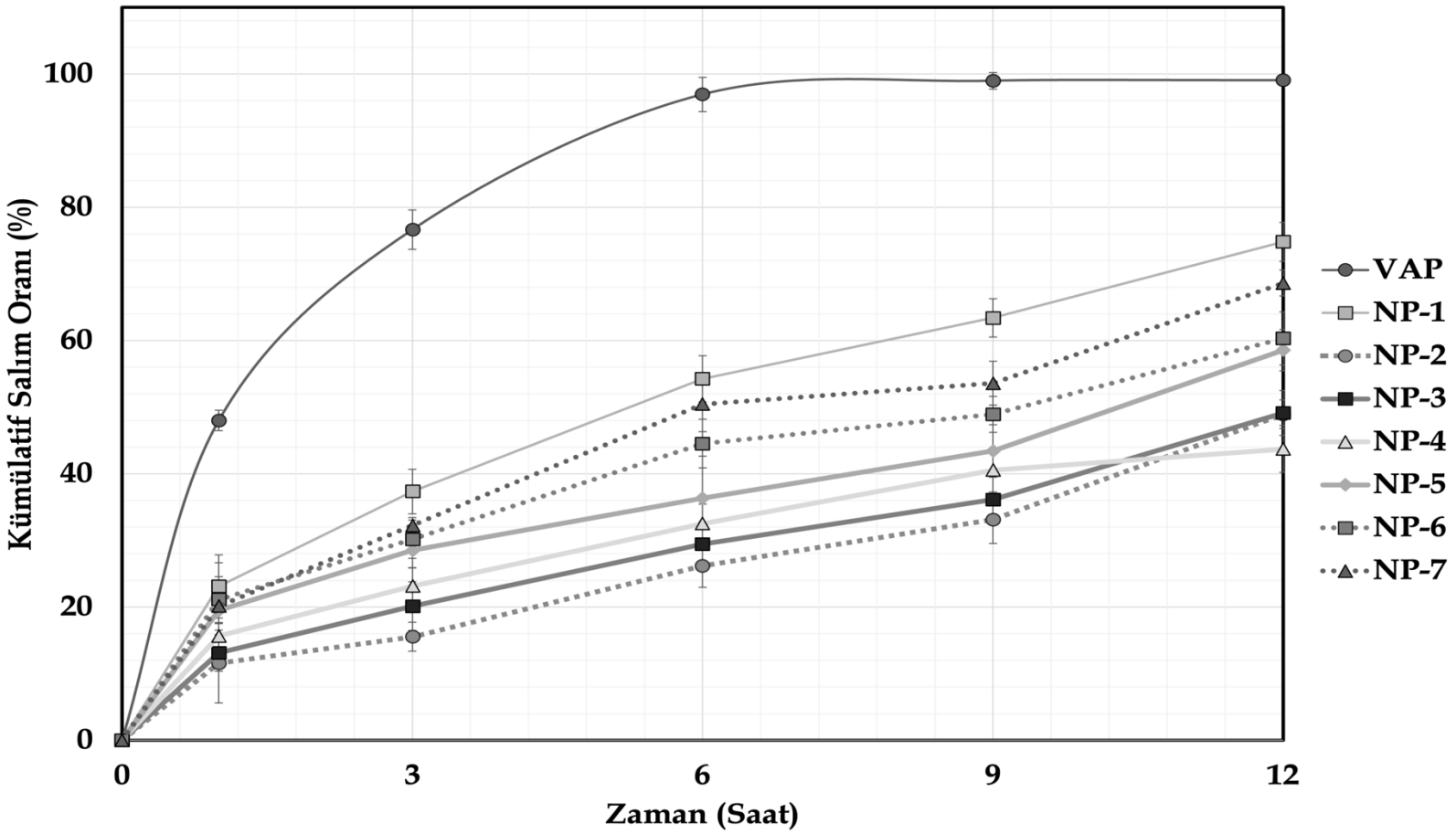
Süre (Saat)	VAP	NP-1	NP-2	NP-3	NP-4	NP-5	NP-6	NP-7
1	48.01 ± 1.51	23.09 ± 4.74	11.56 ± 5.96	13.10 ± 2.76	15.65 ± 3.95	19.48 ± 2.93	21.12 ± 3.43	20.14 ± 6.50
3	76.64 ± 2.96	37.34 ± 3.32	15.53 ± 2.17	20.12 ± 3.65	23.14 ± 2.75	28.51 ± 2.63	30.18 ± 2.87	32.25 ± 1.20
6	96.95 ± 2.56	54.26 ± 3.45	26.18 ± 3.23	29.44 ± 3.35	32.53 ± 2.93	36.33 ± 6.34	44.54 ± 3.63	50.45 ±4.10
9	98.99 ± 1.25	63.40 ± 2.87	33.12 ± 3.57	36.14 ± 3.74	40.56 ± 3.32	43.44 ± 3.94	48.92 ± 2.67	53.61 ±3.31
12	99.07 ± 0.51	74.82 ± 2.93	48.94 ± 2.16	49.13 ± 3.35	43.72 ± 3.53	58.56 ± 3.12	60.33 ±3.98	68.62 ± 1.94
24	99.07 ± 0.51	84.13 ± 2.64	57.93 ± 4.43	65.17 ± 2.65	69.18 ± 3.76	71.74 ± 2.87	74.76 ± 2.46	80.35 ± 5.74
48	99.07 ± 0.51	86.53 ± 3.04	63.85 ± 4.02	70.25 ± 4.12	73.14 ± 2.98	76.92 ± 2.65	78.72 ± 3.44	81.74 ± 1.34
72	99.07 ± 0.51	88.24 ± 2.12	76.14 ± 3.35	78.42 ± 4.43	81.64 ± 2.77	82.84 ± 2.87	82.85 ± 2.76	83.13 ± 1.75



Şekil 5.35. *Hazırlanan formülasyonların 72 saatlik kümülatif dissolüsyon oranları*



Şekil 5.36. *Hazırlanan formülasyonların 24 saatlik kümülatif dissolüsyon oranları*



Şekil 5.37. *Hazırlanan formülasyonların 12 saatlik kümülatif dissolüsyon oranları*

5.3.5. Dissolüsyon kinetiği

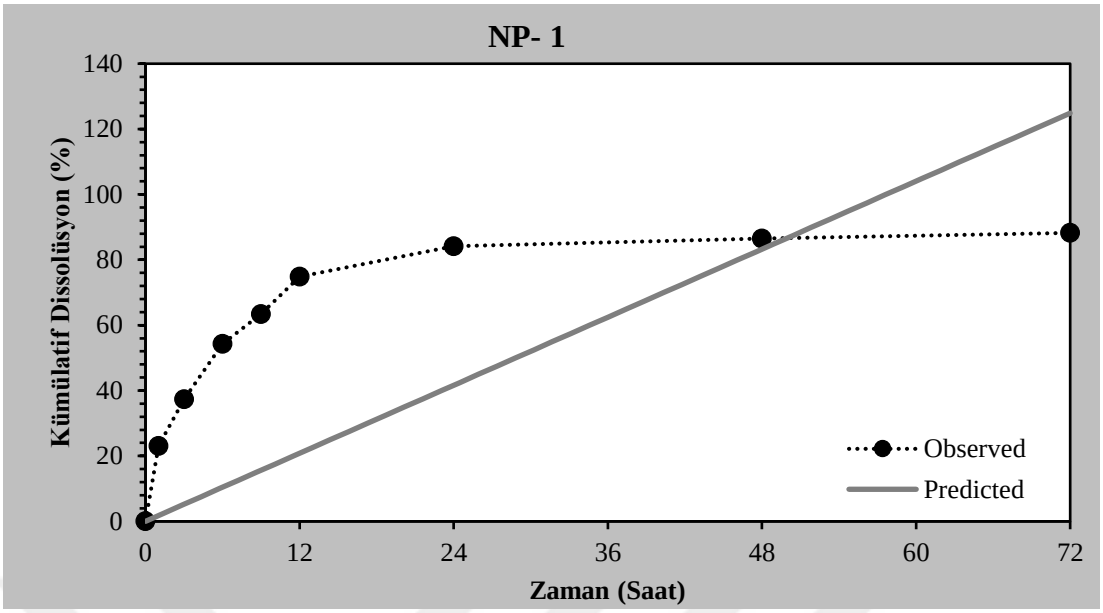
5.3.5.1. *Sıfırıncı derece kinetik sonuçları*

Hazırlanan 7 nanopartikül formülasyonu için *in vitro* dissolüsyon çalışması verileri Sıfırıncı Derece Kinetik modelle uygulanmış ve sıfırıncı derece kinetiğe ait parametreler Tablo 5.16.'da gösterilmiştir. DDSolver programından alınan Sıfırıncı Derece Kinetik dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.38., Şekil 5.39., Şekil 5.40., Şekil 5.41., Şekil 5.42., Şekil 5.43. ve Şekil 5.44.'te sunulmuştur.

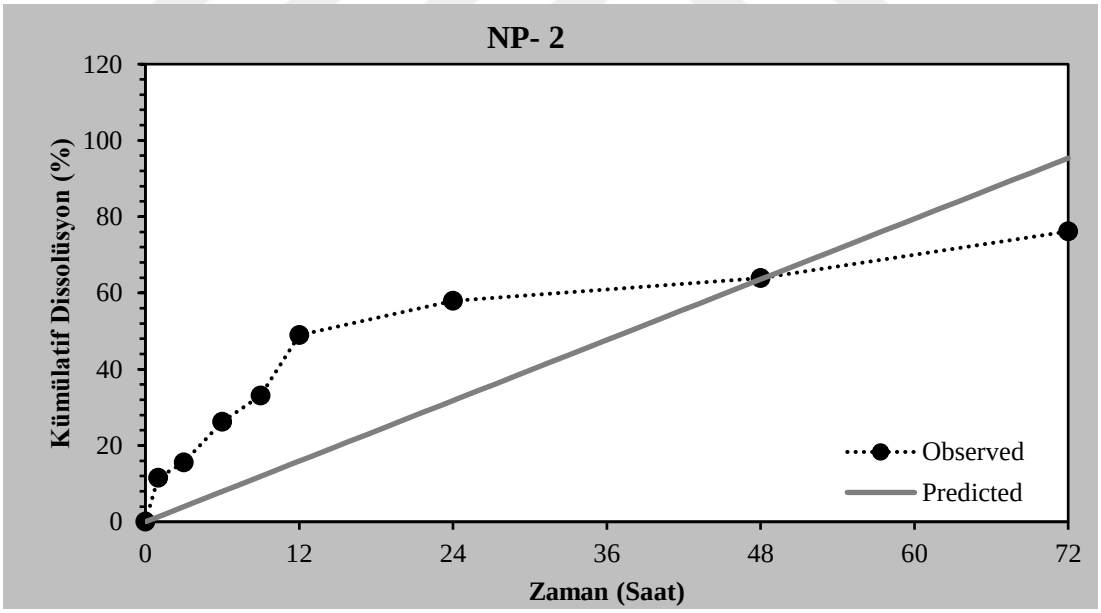
Tablo 5.16. *Sıfırıncı derece kinetik için in vitro dissolüsyon kinetiği bulguları*

***Tablo açıklamaları:** **Rsqr:** korelasyon katsayısı (r^2), **Rsqr_adj:** düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$), **AIC:** Akaike bilgi kriteri, **MSC:** Model seçme kriteri.*

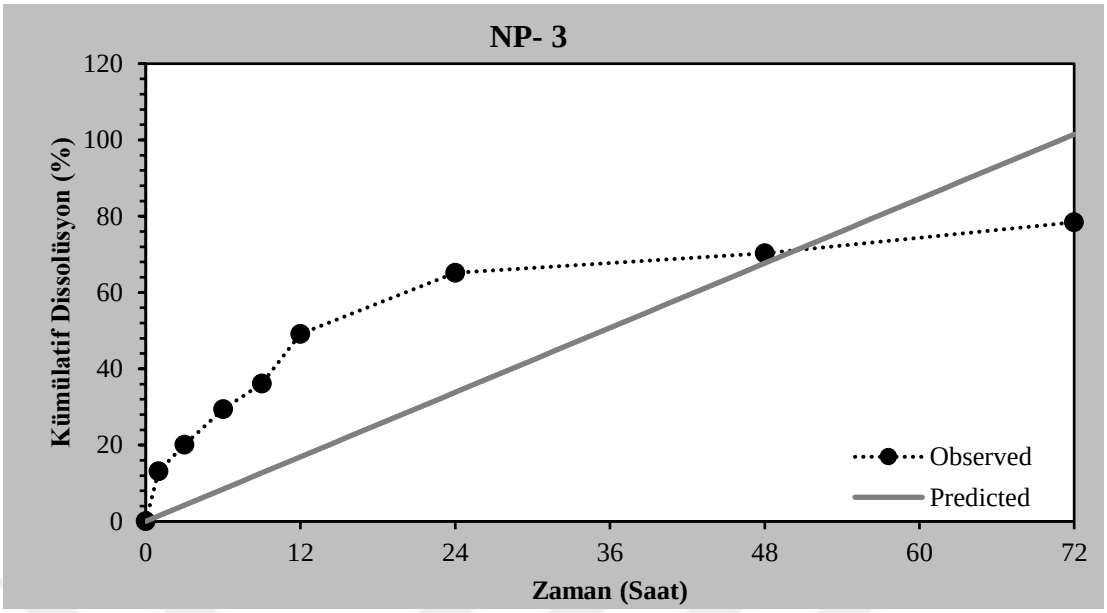
Parametre	NP-1	NP-2	NP-3	NP-4	NP-5	NP-6	NP-7
Rsqr	-0.522	0.418	0.338	0.308	0.038	-0.176	-0.355
Rsqr_adj	-0.522	0.418	0.338	0.308	0.038	-0.176	-0.355
AIC	86.362	74.540	76.507	77.261	80.463	82.296	84.481
MSC	-1.184	0.030	-0.126	-0.193	-0.597	-0.858	-1.017



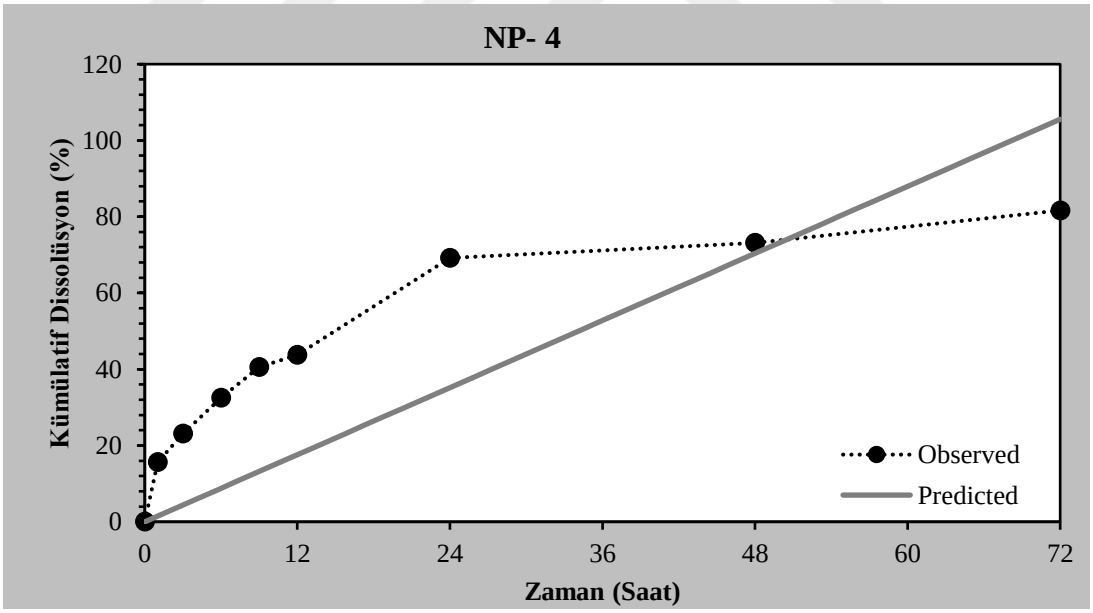
Şekil 5.38. *NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Sıfırıncı derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



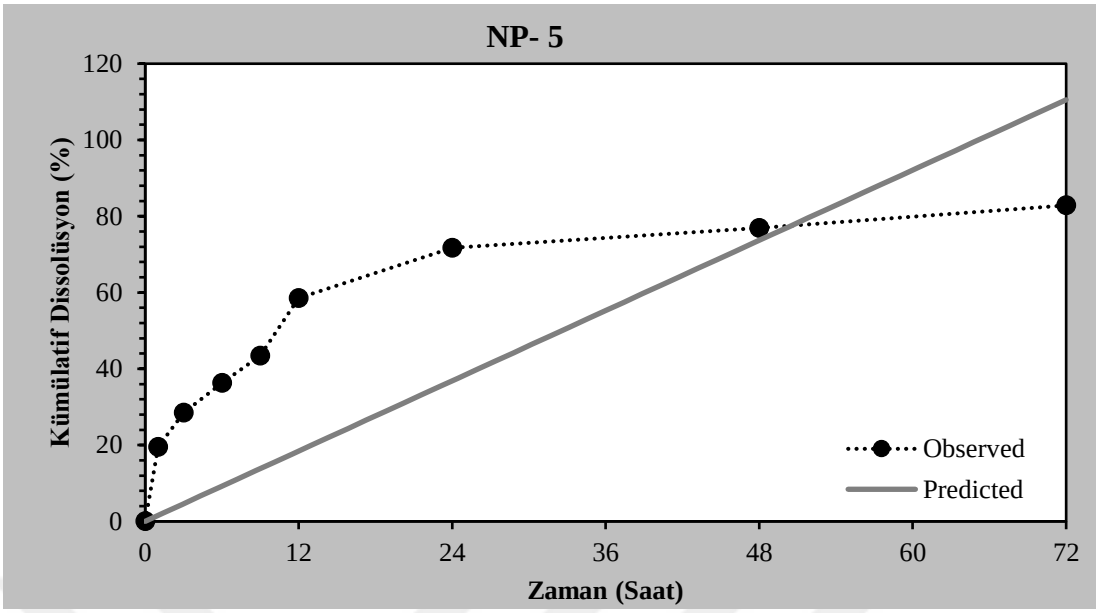
Şekil 5.39. *NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Sıfırıncı derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



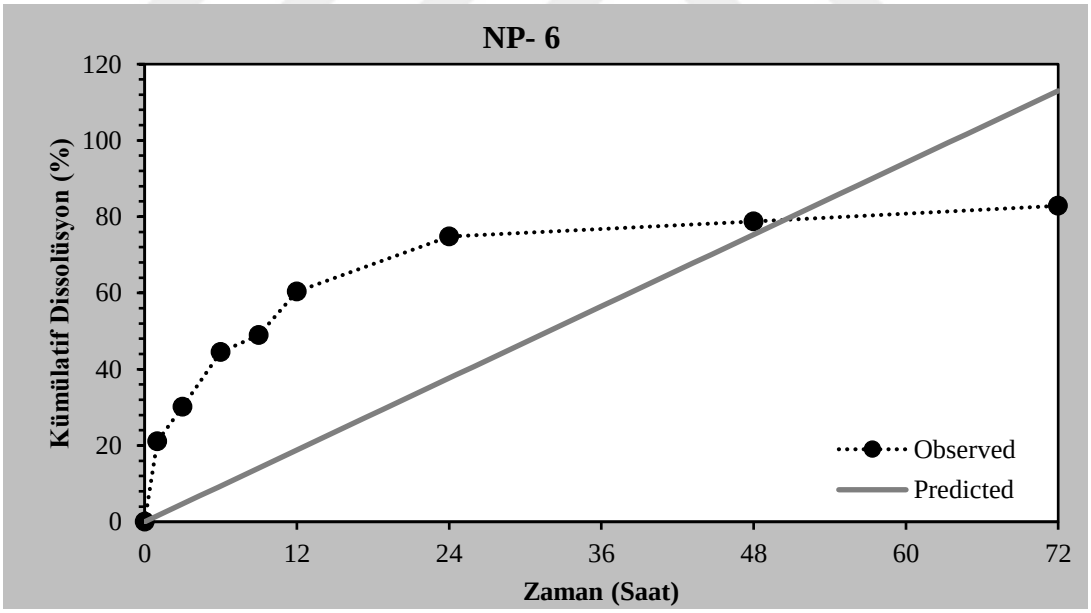
Şekil 5.40. *NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik)*
*****Observed:*** *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****: Sıfırıncı derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



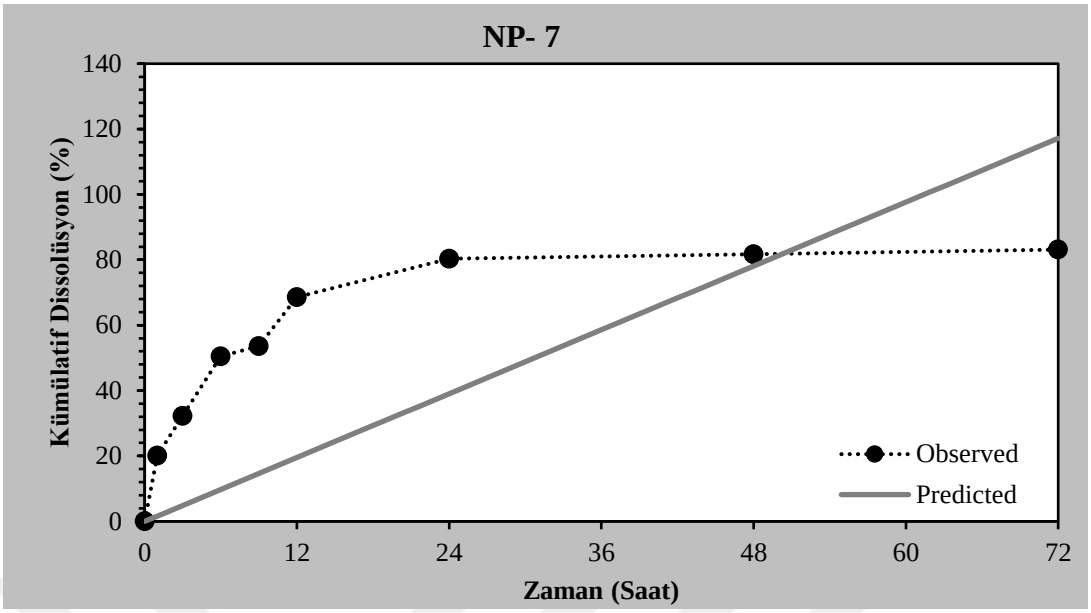
Şekil 5.41. *NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik)*
*****Observed:*** *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****: Sıfırıncı derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.42. *NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik)*
**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Sıfırıncı derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.43. *NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik)*
**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Sıfırıncı derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.44. *NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Sıfırıncı Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Sıfırıncı derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*

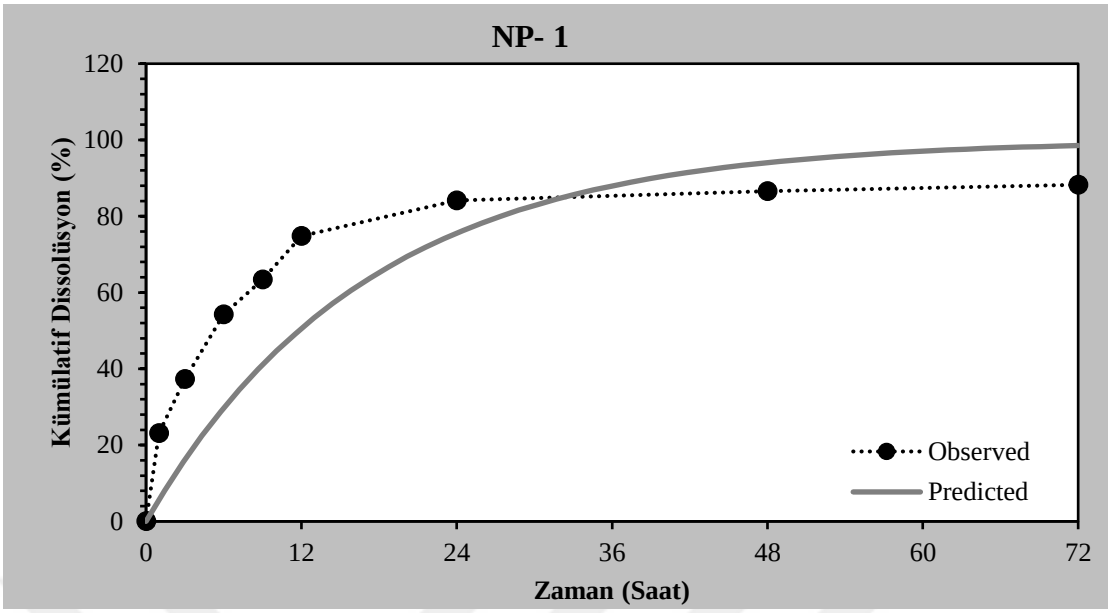
5.3.5.2. *Birinci derece kinetik sonuçları*

Hazırlanan 7 nanopartikül formülasyonu için *in vitro* dissolüsyon çalışması verileri Birinci Derece Kinetik modeline uygulanmış ve birinci derece kinetiğe ait parametreler Tablo 5.17.'de gösterilmiştir. DDSolver programından alınan Birinci Derece Kinetik dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.45., Şekil 5.46., Şekil 5.47., Şekil 5.48., Şekil 5.49., Şekil 5.50. ve Şekil 5.51.'de sunulmuştur.

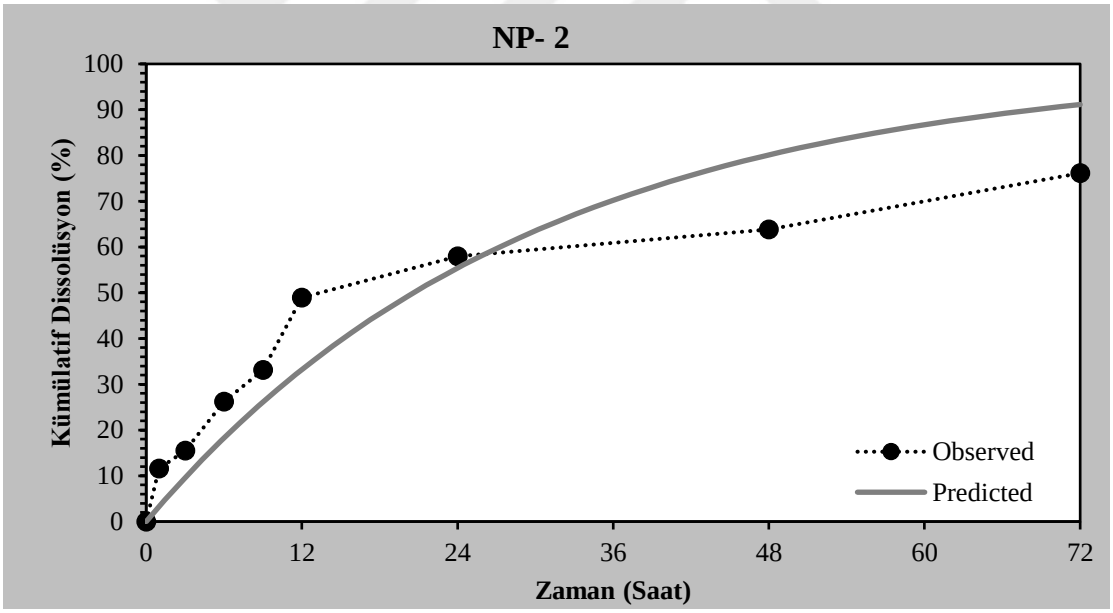
Tablo 5.17. *Birinci derece kinetik için in vitro dissolüsyon kinetiği bulguları*

Tablo açıklamaları:** ***Rsqr: *korelasyon katsayısı (r^2),* ***Rsqr_adj:*** *düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$),* ***AIC:*** *Akaike bilgi kriteri,* ***MSC:*** *Model seçme kriteri.*

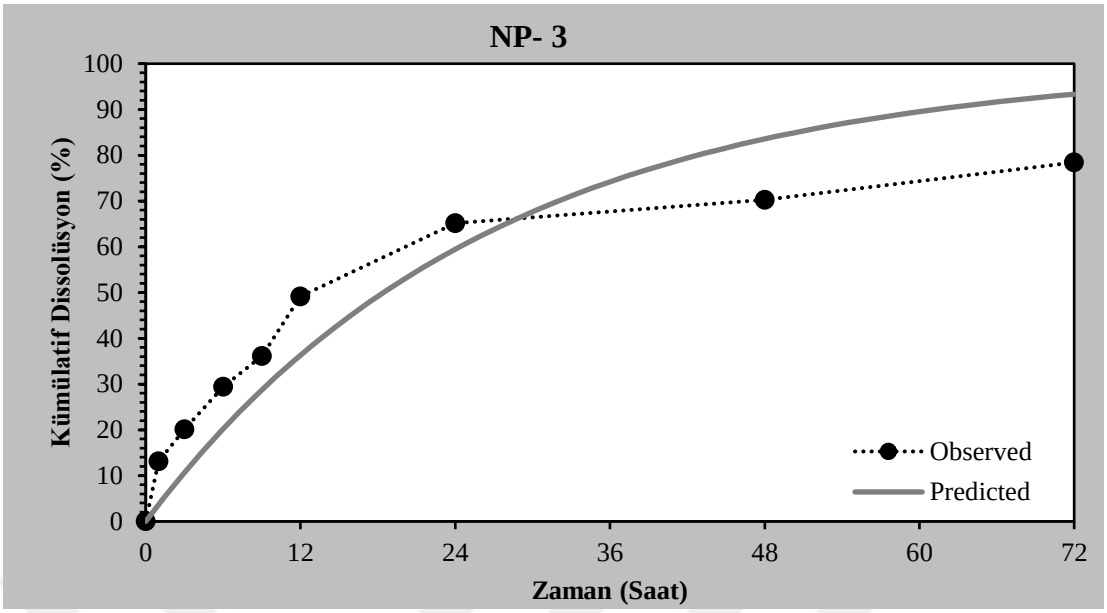
Parametre	NP-1	NP-2	NP-3	NP-4	NP-5	NP-6	NP-7
Rsqr	0.654	0.824	0.846	0.858	0.781	0.705	0.651
Rsqr_adj	0.654	0.824	0.846	0.858	0.781	0.705	0.651
AIC	73.025	63.776	63.367	63.036	67.147	69.859	72.269
MSC	0.298	1.226	1.334	1.388	0.883	0.524	0.340



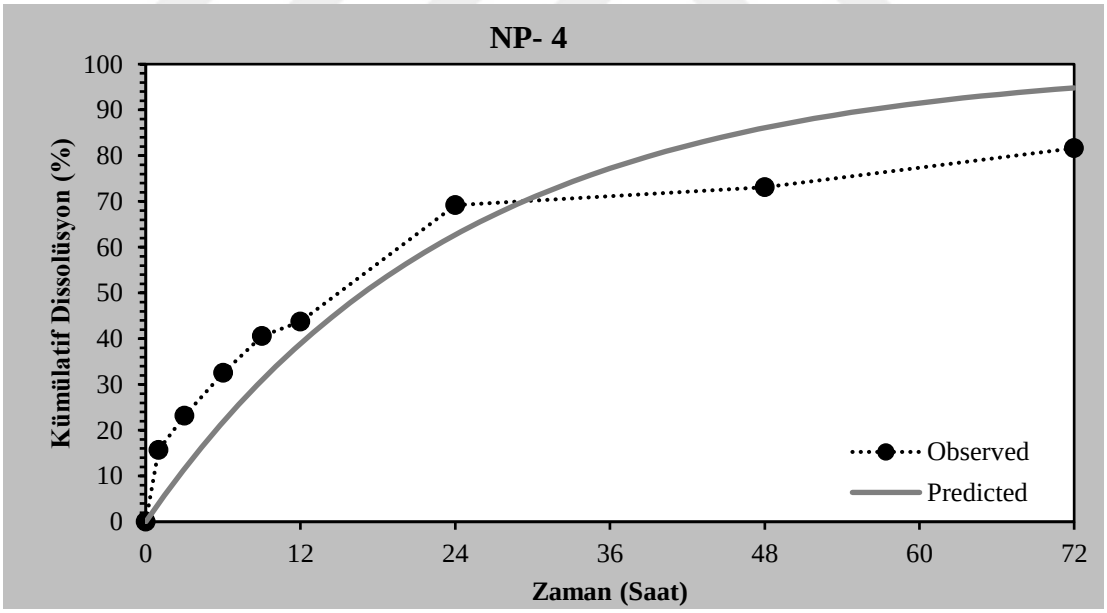
Şekil 5.45. *NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Birinci derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



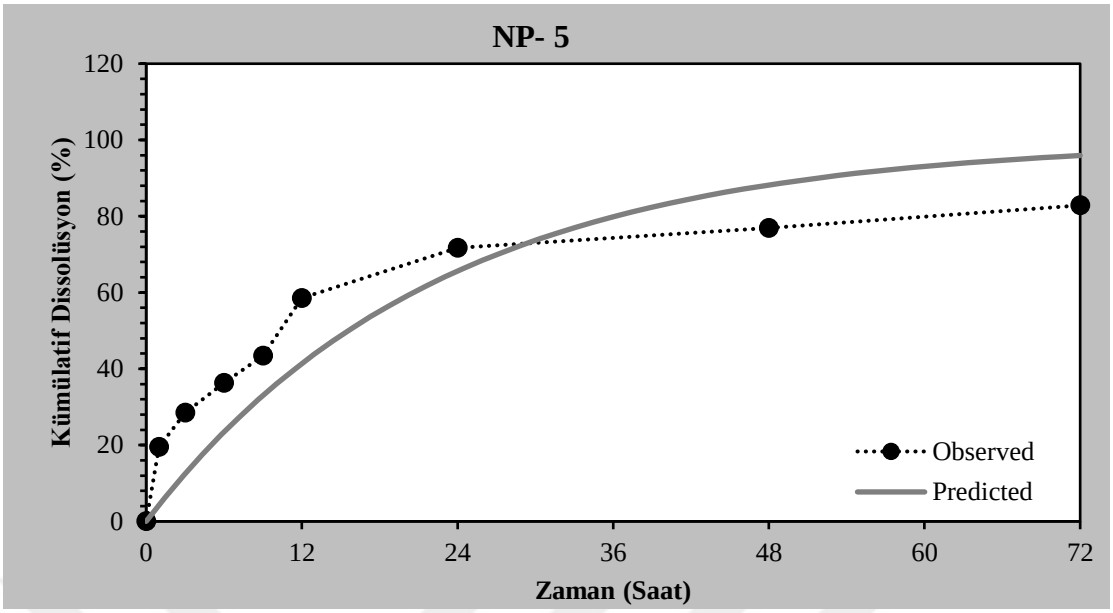
Şekil 5.46. *NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Birinci derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



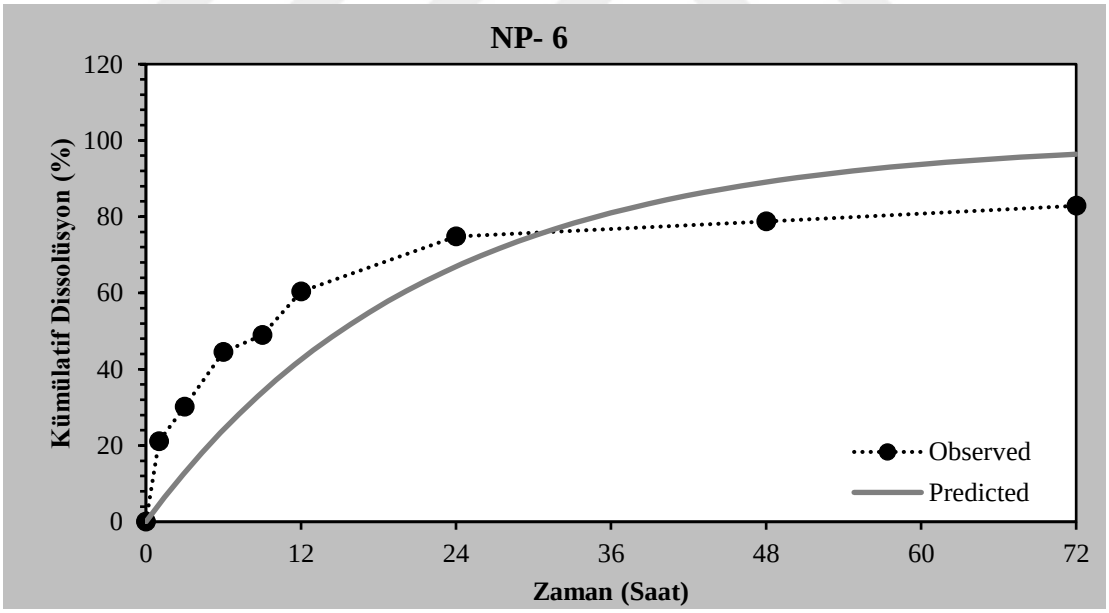
Şekil 5.47. *NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Birinci derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



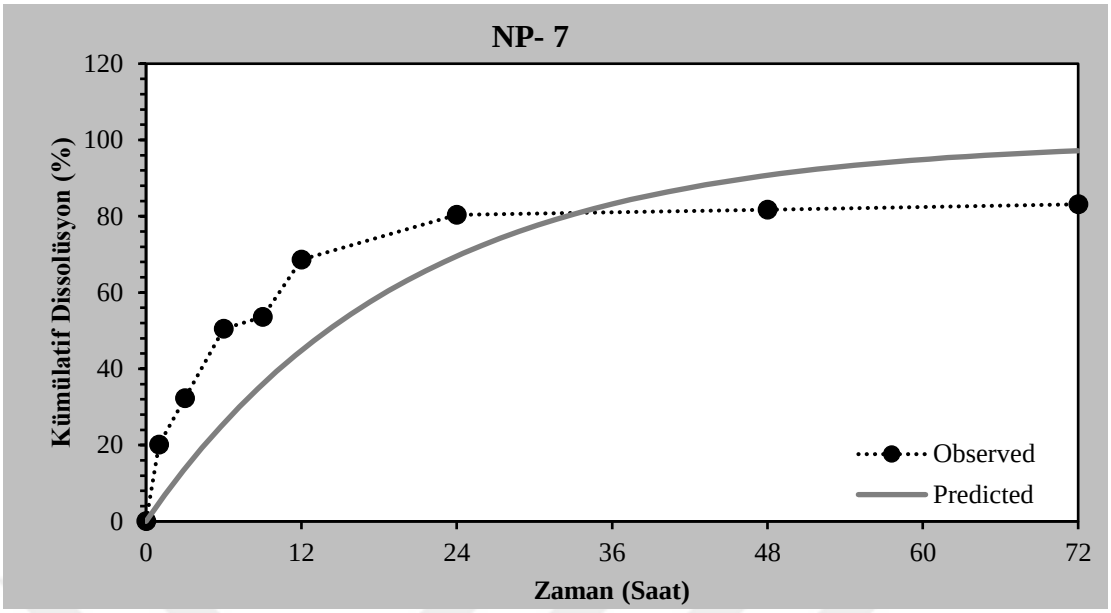
Şekil 5.48. *NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Birinci derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.49. *NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Birinci derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.50. *NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Birinci derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.51. *NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Birinci Derece Kinetik)*
Observed:* *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted**: Birinci derece kinetik için beklenen dissolüsyon profili*

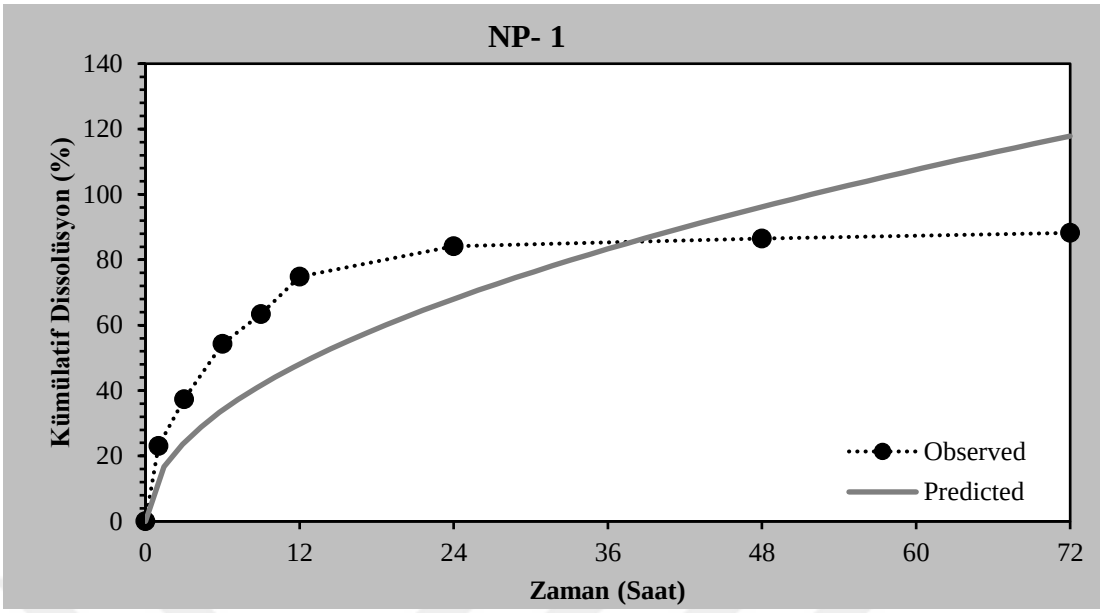
5.3.5.3. *Higuchi modeli sonuçları*

Hazırlanan 7 nanopartikül formülasyonu için *in vitro* dissolüsyon çalışması verileri Higuchi modeline uygulanmış ve Higuchi modele ait parametreler Tablo 5.18.'de gösterilmiştir. DDSolver programından alınan Higuchi modeli dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.52., Şekil 5.53., Şekil 5.54., Şekil 5.55., Şekil 5.56., Şekil 5.57. ve Şekil 5.58.'de sunulmuştur.

Tablo 5.18. Higuchi modeli *için in vitro dissolüsyon kinetiği bulguları*

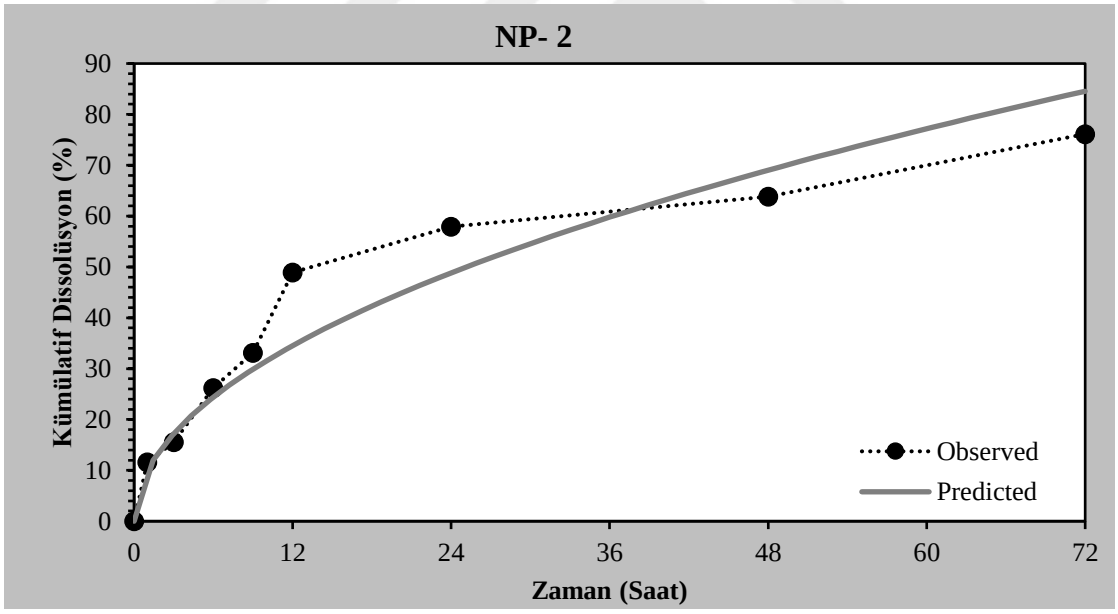
Tablo açıklamaları:** ***Rsqr: *korelasyon katsayısı (r^2),* ***Rsqr_adj:*** *düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$),* ***AIC:*** *Akaike bilgi kriteri,* ***MSC:*** *Model seçme kriteri.*

Parametre	NP-1	NP-2	NP-3	NP-4	NP-5	NP-6	NP-7
Rsqr	0.601	0.925	0.914	0.913	0.831	0.759	0.667
Rsqr_adj	0.601	0.925	0.914	0.913	0.831	0.759	0.667
AIC	74.312	56.097	58.132	58.550	64.795	68.046	71.847
MSC	0.155	2.079	1.916	1.886	1.144	0.725	0.387



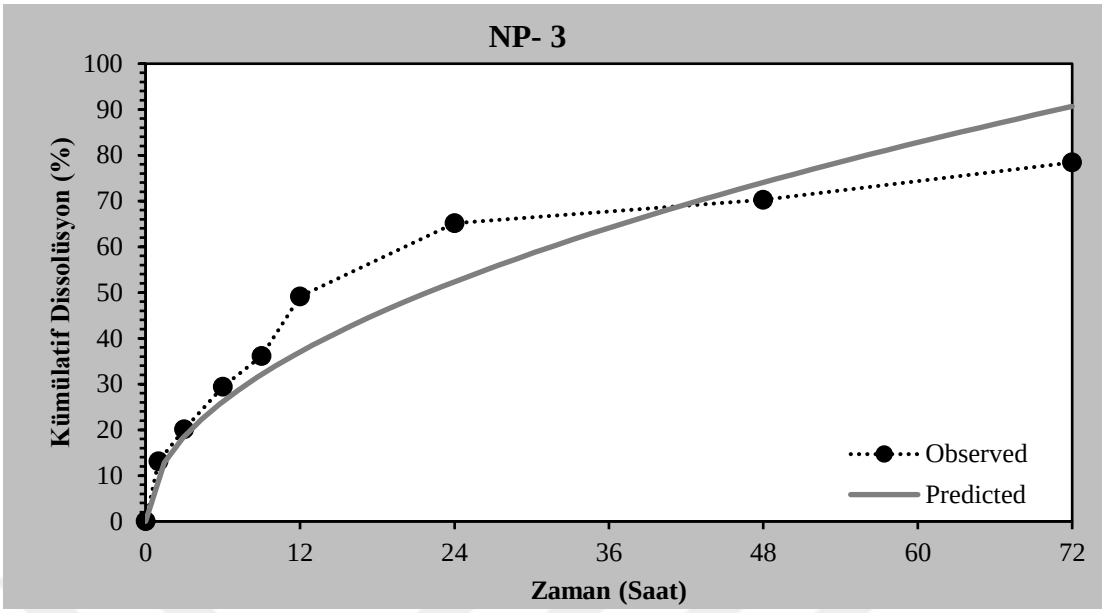
Şekil 5.52. *NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__:Higuchi modeli için beklenen dissolüsyon profili*



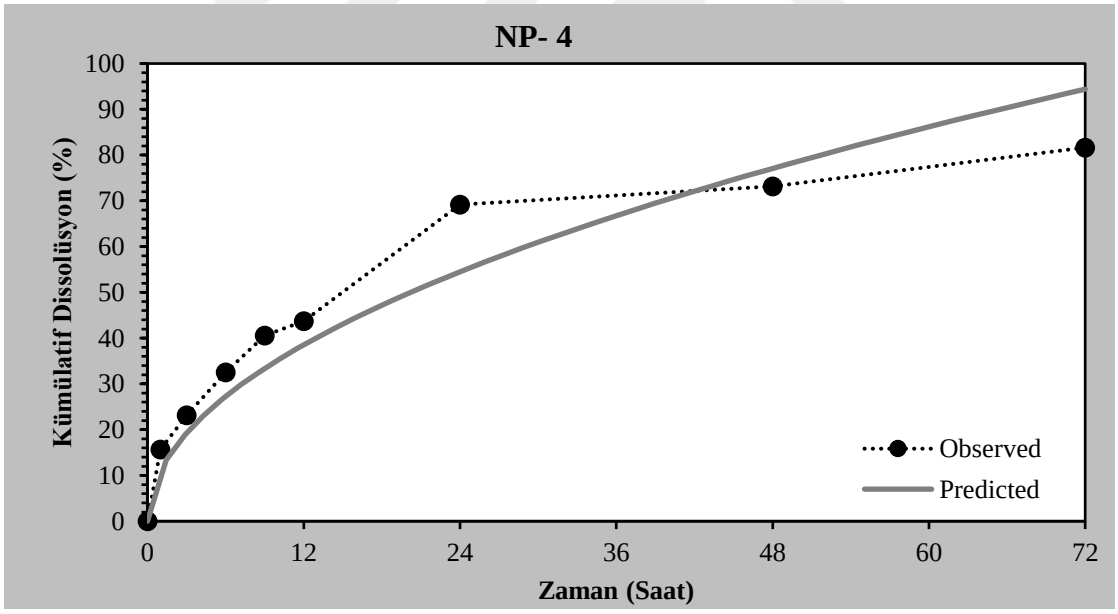
Şekil 5.53. *NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__:Higuchi modeli için beklenen dissolüsyon profili*



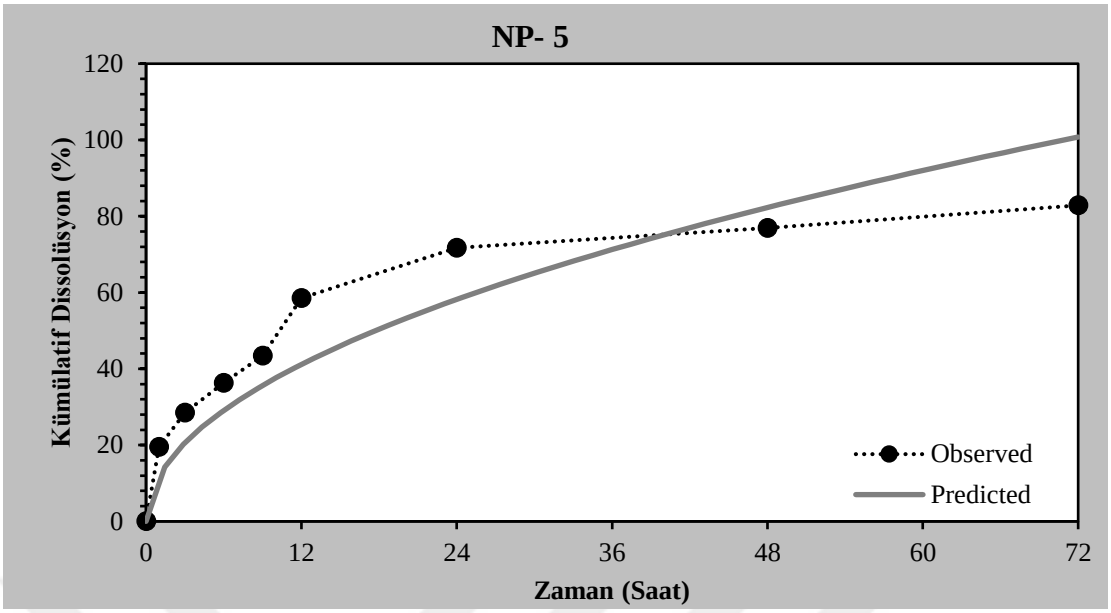
Şekil 5.54. *NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli)*

*****Observed:*** *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Higuchi modeli için beklenen dissolüsyon profili*



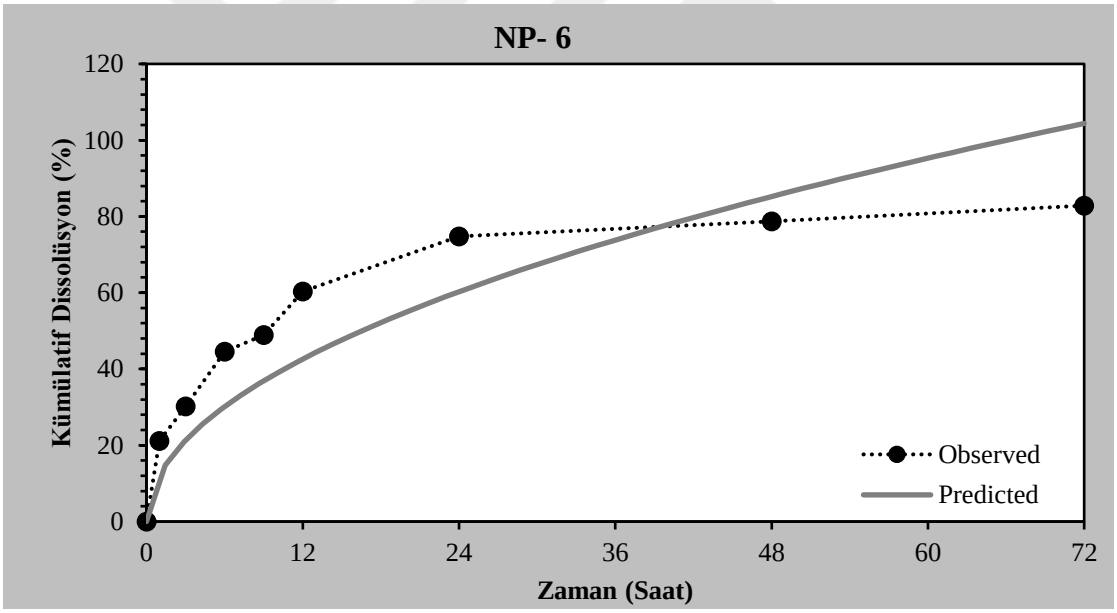
Şekil 5.55. *NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli)*

*****Observed:*** *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Higuchi modeli için beklenen dissolüsyon profili*



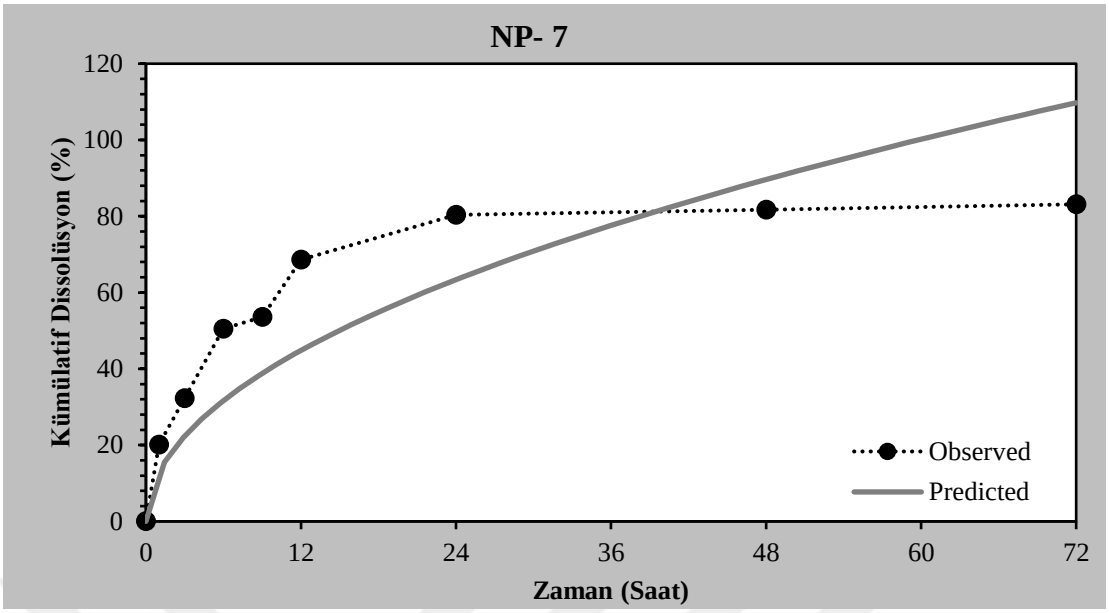
Şekil 5.56. *NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__:Higuchi modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.57. *NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__:Higuchi modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.58. *NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Higuchi Modeli)*

Observed:** *Elde edilen dissolüsyon profili,* **Predicted:Higuchi modeli için beklenen dissolüsyon profili*

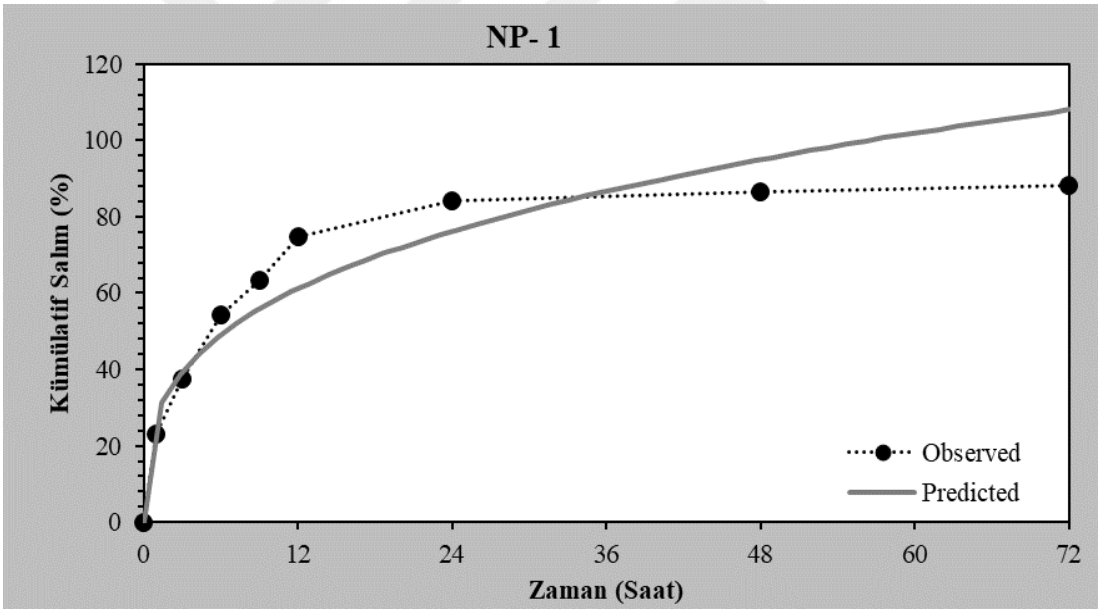
5.3.5.4. *Korsmeyer-Peppas modeli sonuçları*

Hazırlanan 7 nanopartikül formülasyonu için *in vitro* dissolüsyon çalışması verileri Korsmeyer-Peppas modeline uygulanmış ve Korsmeyer-Peppas modele ait parametreler Tablo 5.19.'da gösterilmiştir. DDSolver programından alınan Korsmeyer-Peppas modeli dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.59., Şekil 5.60., Şekil 5.61., Şekil 5.62., Şekil 5.63., Şekil 5.64. ve Şekil 5.65.'de sunulmuştur.

Tablo 5.19. *Korsmeyer-Peppas modeli için in vitro dissolüsyon kinetiği bulguları*

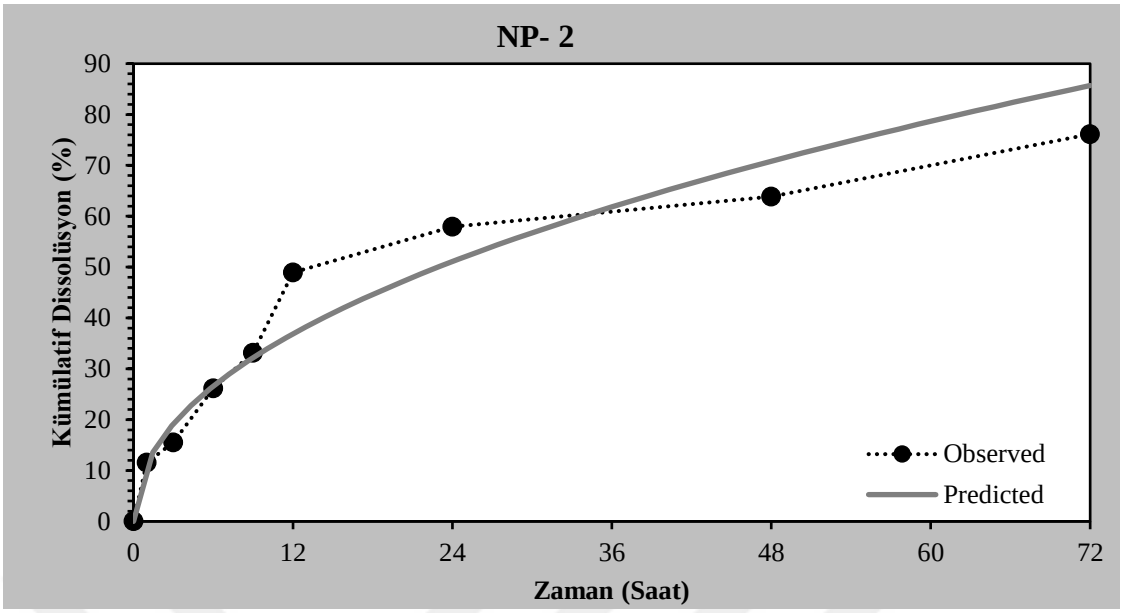
***Tablo açıklamaları:** **Rsqr:** korelasyon katsayısı (r^2), **Rsqr_adj:** düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$), **AIC:** Akaike bilgi kriteri, **MSC:** Model seçme kriteri, **n**: dissolüsyon mekanizmasını gösteren difüzyon üssü.*

Parametre	NP-1	NP-2	NP-3	NP-4	NP-5	NP-6	NP-7
Rsqr	0.894	0.936	0.945	0.964	0.953	0.946	0.891
Rsqr_adj	0.878	0.927	0.937	0.959	0.947	0.939	0.875
AIC	64.423	56.651	56.200	52.659	55.231	56.520	63.825
MSC	1.254	2.017	2.131	2.541	2.207	2.006	1.279
n	0.318	0.471	0.442	0.407	0.358	0.335	0.341



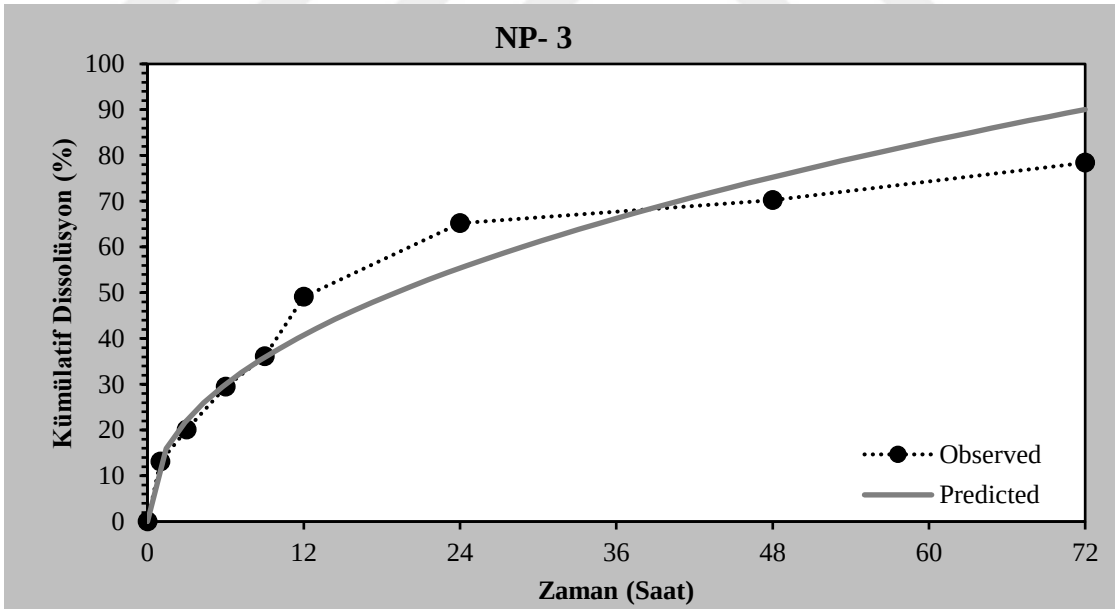
Şekil 5.59. *NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli)*

Observed: *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen dissolüsyon profili*



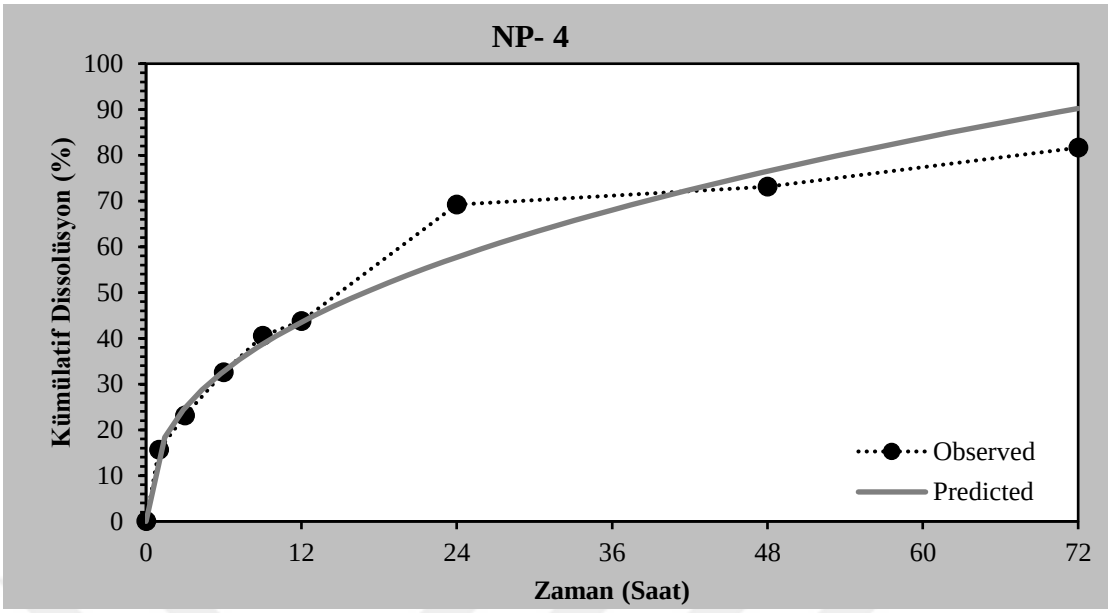
Şekil 5.60. *NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen dissolüsyon profili*



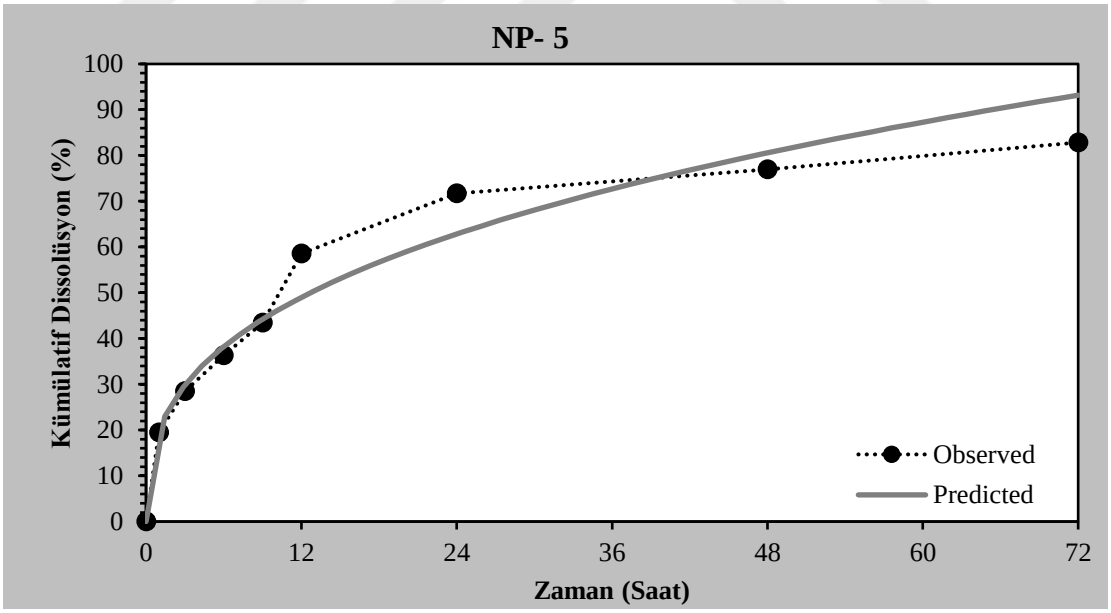
Şekil 5.61. *NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen dissolüsyon profili*



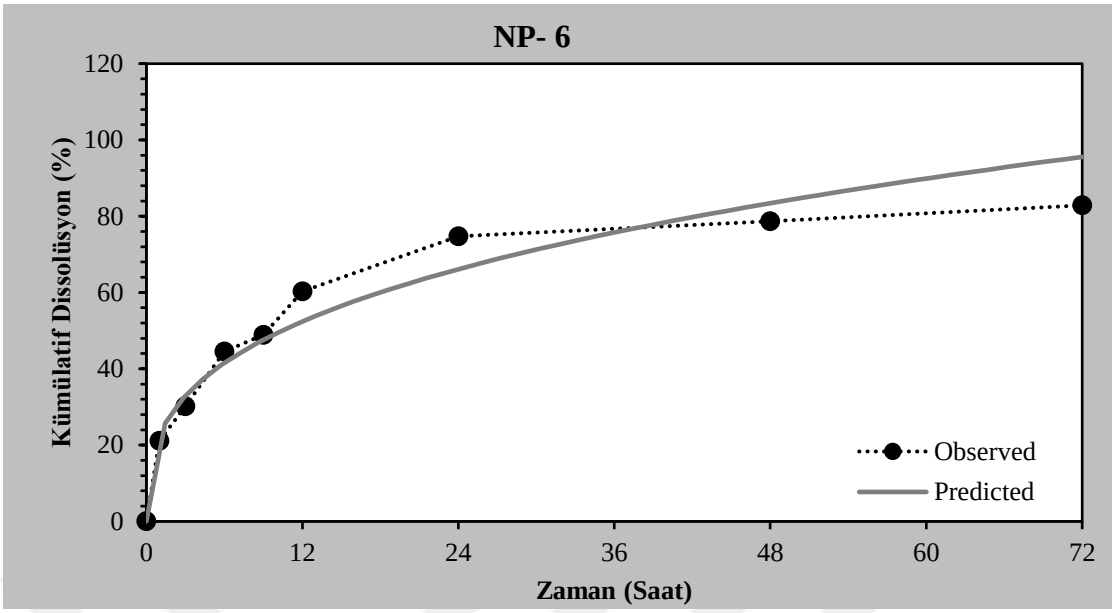
Şekil 5.62. *NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen dissolüsyon profili*



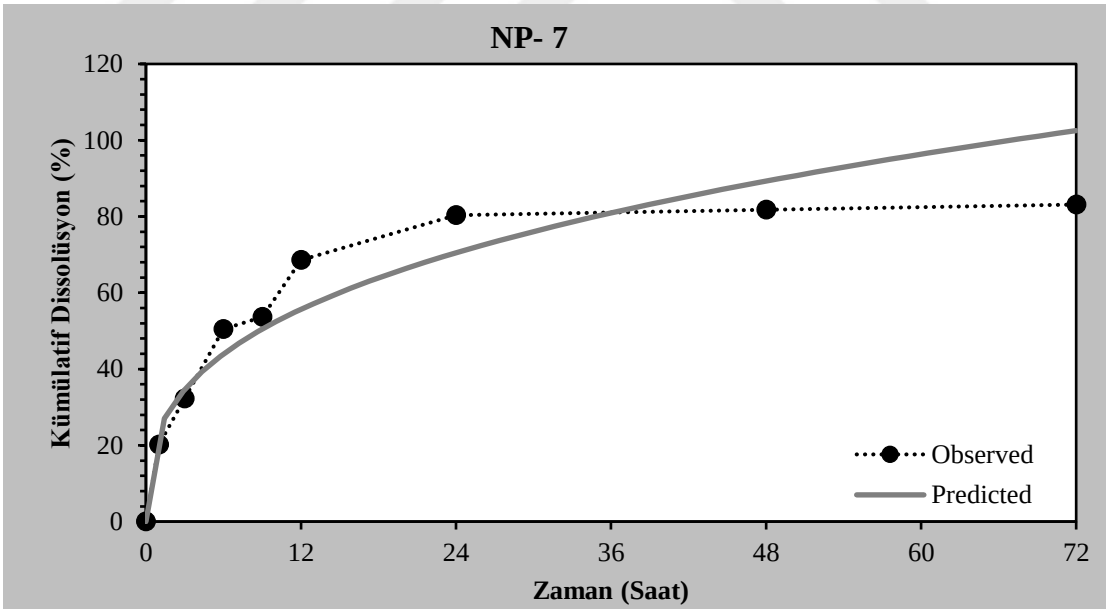
Şekil 5.63. *NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.64. *NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Korsmeyer-Peppas Modeli)*

****Observed:*** *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.65. NP-7 *formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği* (Korsmeyer-Peppas Modeli)

***Observed:** Elde edilen dissolüsyon profili, **Predicted**: Korsmeyer-Peppas modeli için beklenen dissolüsyon profili

5.3.5.5. *Hixson-Crowell modeli sonuçları*

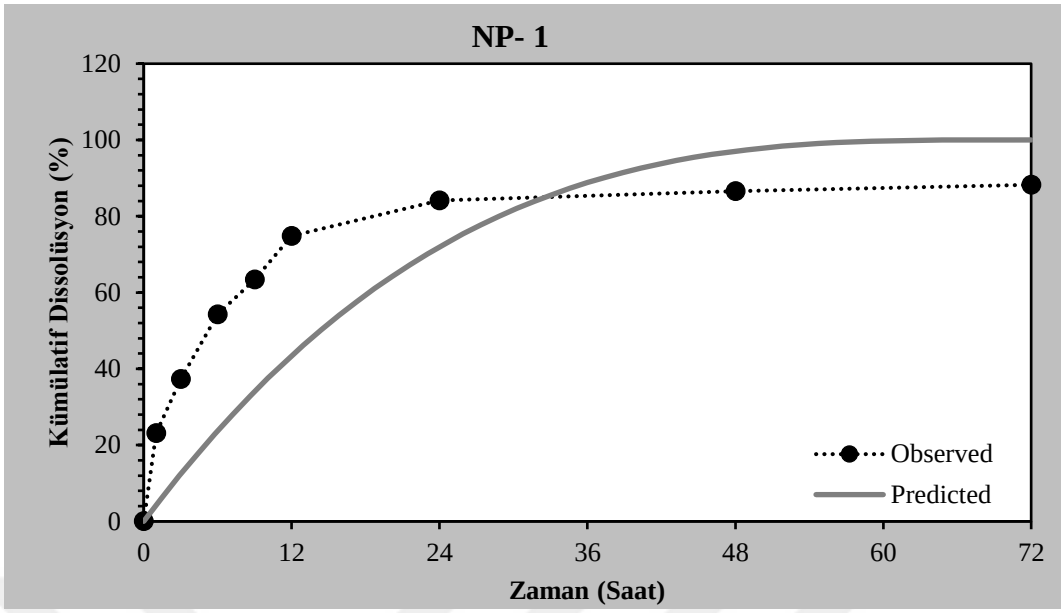
Hazırlanan 7 nanopartikül formülasyonu için *in vitro* dissolüsyon çalışması verileri Hixson-Crowell modeline uygulanmış ve Hixson-Crowell modele ait parametreler Tablo 5.20.'de gösterilmiştir. DDSolver programından alınan Hixson-Crowell modeli dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.66., Şekil 5.67., Şekil 5.68., Şekil 5.69., Şekil 5.70., Şekil 5.71. ve Şekil 5.72.'de sunulmuştur.

Tablo 5.20. *Hixson-Crowell modeli için in vitro dissolüsyon kinetiği bulguları*

Tablo açıklamaları:** ***Rsqr: *korelasyon katsayısı (r^2),* ***Rsqr_adj:*** *düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$),* ***AIC:*** *Akaike bilgi kriteri,* ***MSC:*** *Model seçme kriteri*

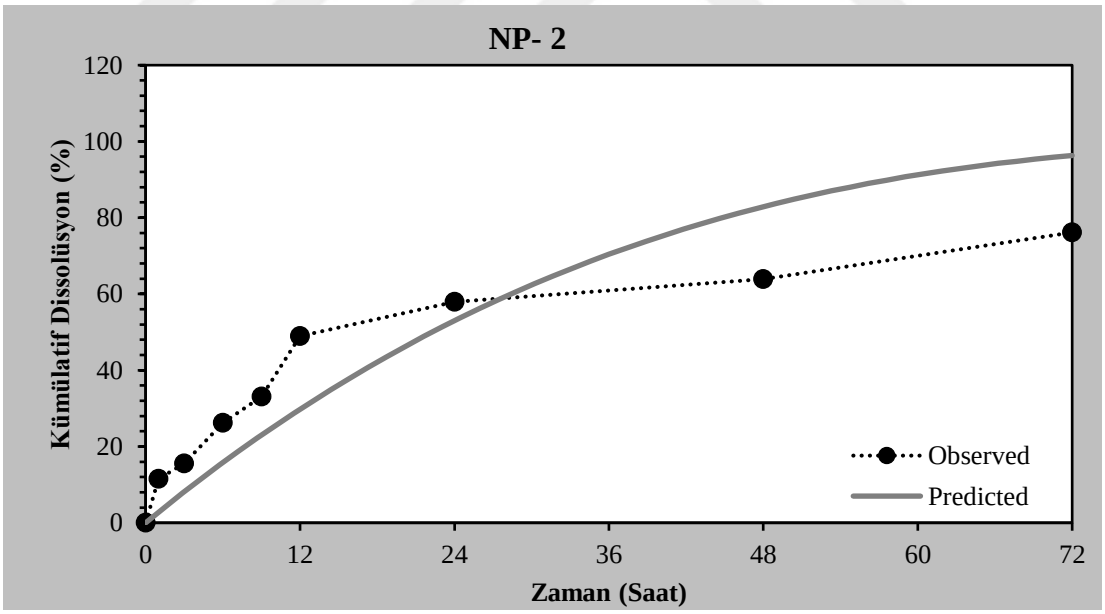
Parametre	**NP-1**	**NP-2**	**NP-3**	**NP-4**	**NP-5**	**NP-6**	**NP-7**
Rsqr	0.463	0.724	0.747	0.762	0.657	0.558	0.488
Rsqr_adj	0.463	0.724	0.747	0.762	0.657	0.558	0.488
AIC	76.986	67.844	67.865	67.653	71.180	73.488	75.718
MSC	-0.142	0.774	0.834	0.875	0.434	0.121	-0.043

.



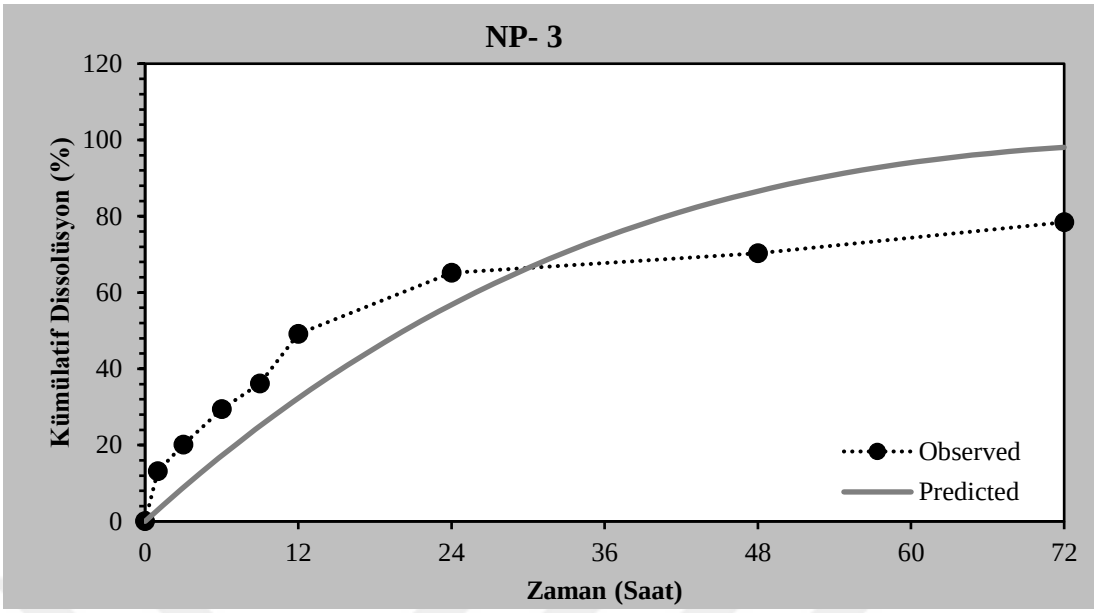
Şekil 5.66. *NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hixson-Crowell modeli için beklenen dissolüsyon profili*



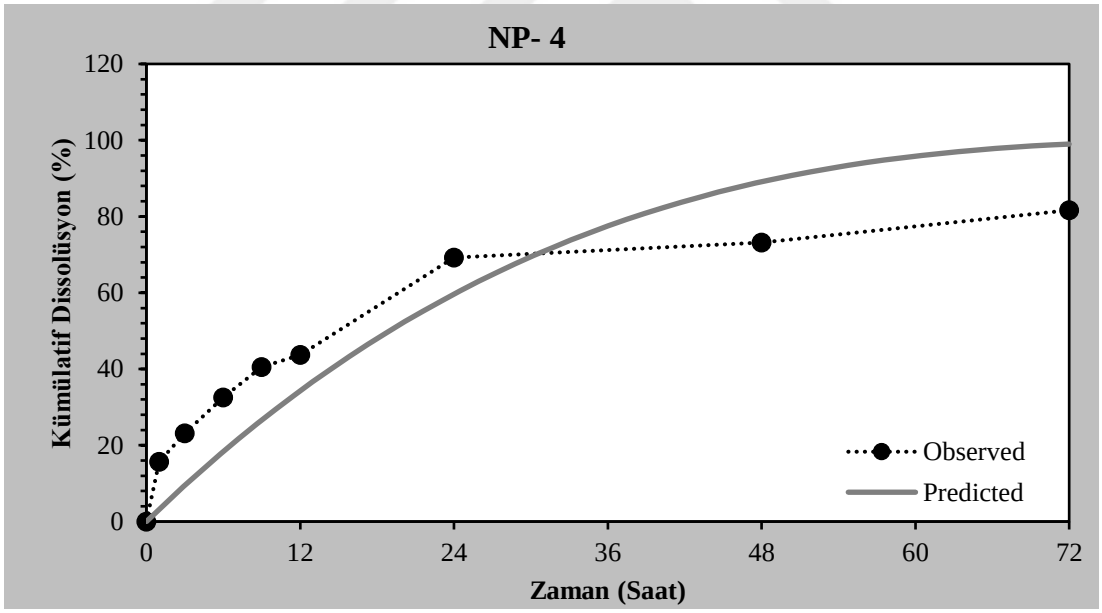
Şekil 5.67. *NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hixson-Crowell modeli için beklenen dissolüsyon profili*



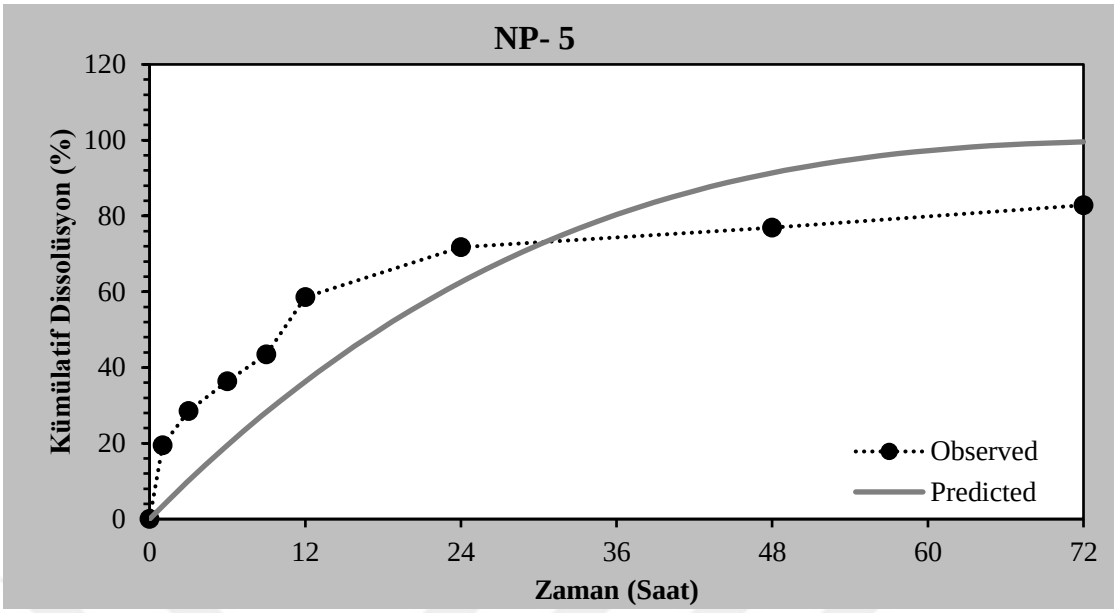
Şekil 5.68. *NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hixson-Crowell modeli için beklenen dissolüsyon profili*



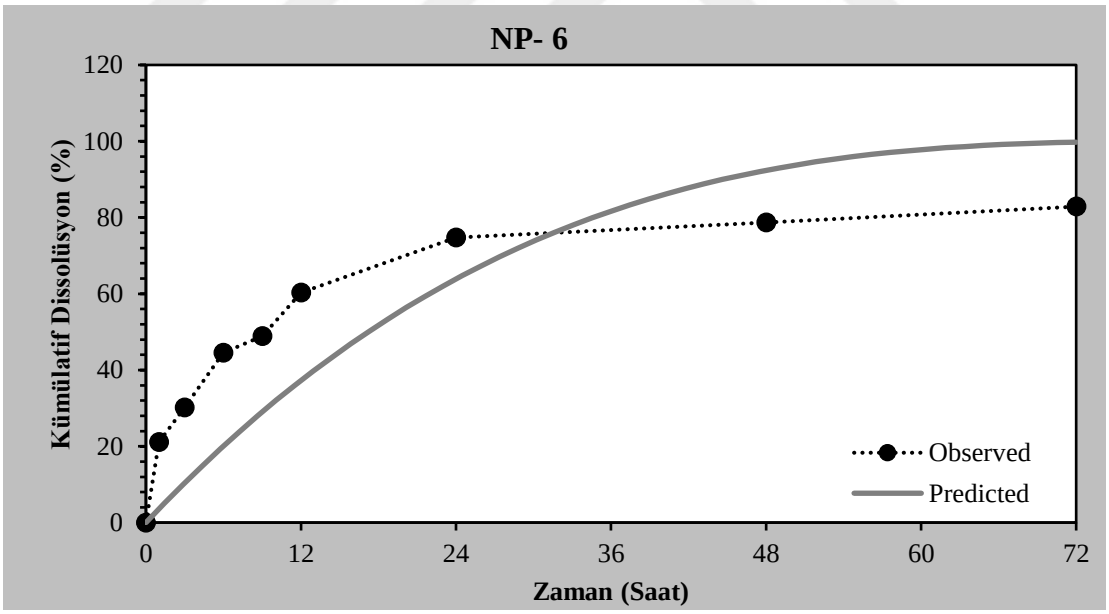
Şekil 5.69. *NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hixson-Crowell modeli için beklenen dissolüsyon profili*



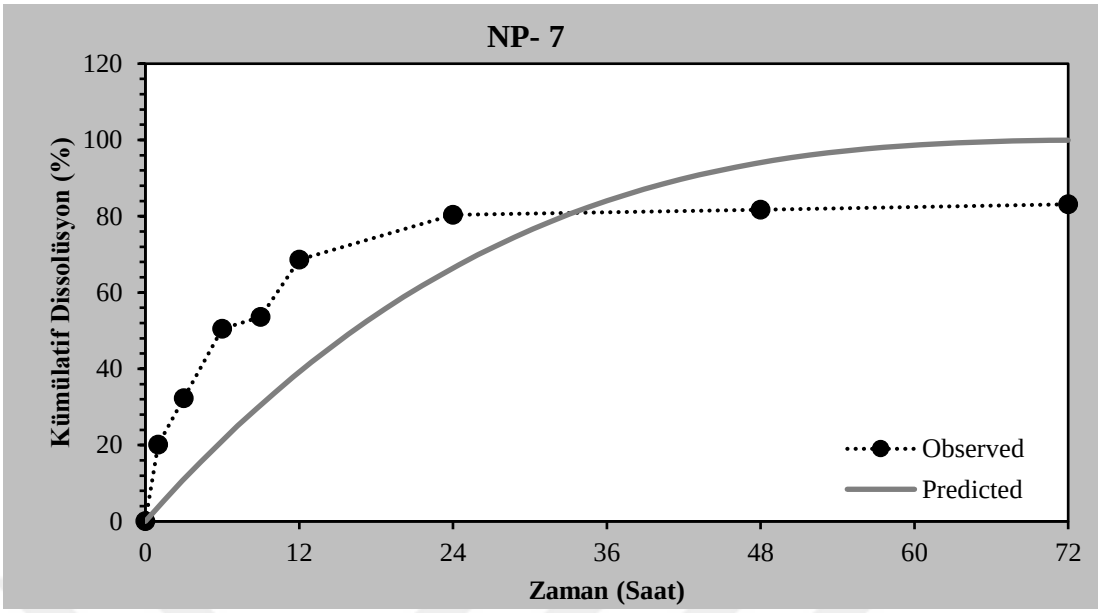
Şekil 5.70. *NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hixson-Crowell modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.71. *NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hixson-Crowell modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.72. *NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hixson-Crowell Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hixson-Crowell modeli için beklenen dissolüsyon profili*

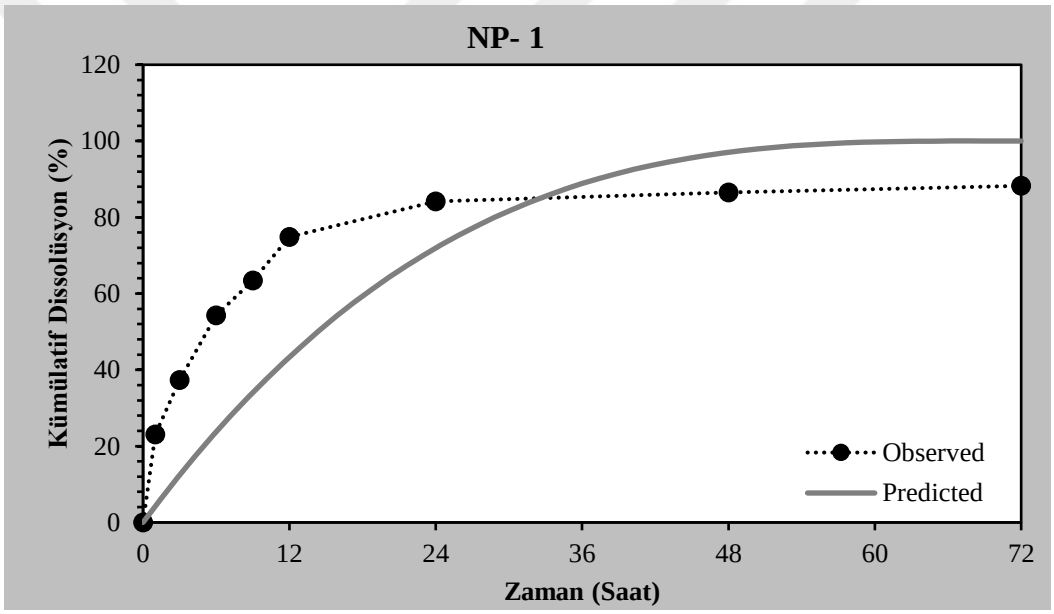
5.3.5.6. *Hopfenberg modeli sonuçları*

Hazırlanan 7 nanopartikül formülasyonu için *in vitro* dissolüsyon çalışması verileri Hopfenberg modeline uygulanmış ve Hopfenberg modele ait parametreler Tablo 5.21.'de gösterilmiştir. DDSolver programından alınan Hopfenberg modeli dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.73., Şekil 5.74., Şekil 5.75., Şekil 5.76., Şekil 5.77., Şekil 5.78. ve Şekil 5.79.'da sunulmuştur.

Tablo 5.21. *Hopfenberg modeli için in vitro dissolüsyon kinetiği bulguları*

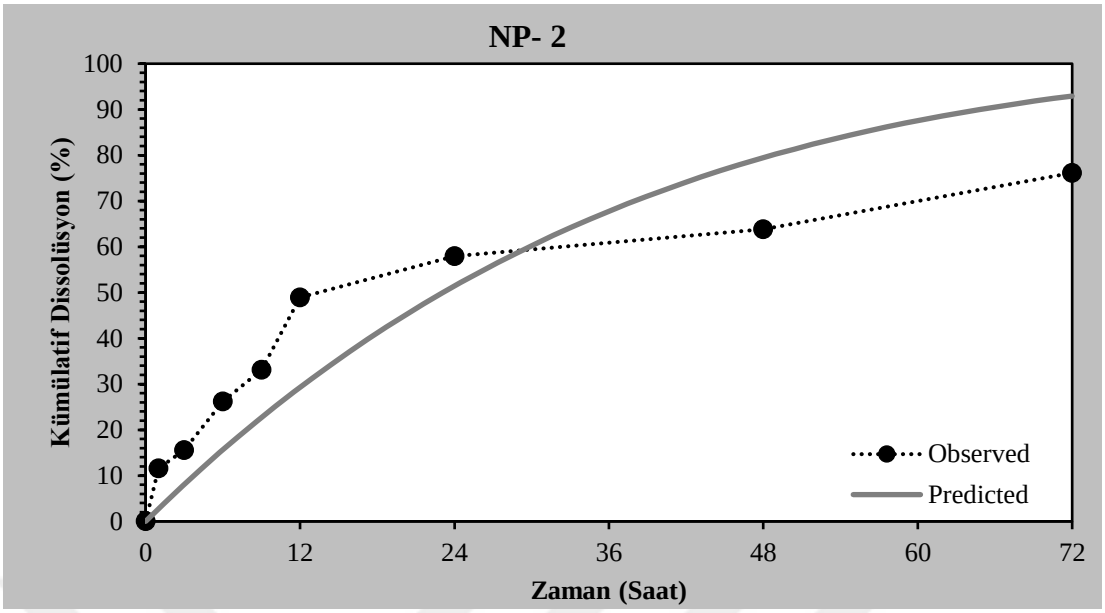
***Tablo açıklamaları:** **Rsqr:** korelasyon katsayısı (r^2), **Rsqr_adj:** düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$), **AIC:** Akaike bilgi kriteri, **MSC:** Model seçme kriteri*

Parametre	NP-1	NP-2	NP-3	NP-4	NP-5	NP-6	NP-7
Rsqr	0.463	0.760	0.771	0.781	0.666	0.562	0.488
Rsqr_adj	0.386	0.726	0.739	0.749	0.619	0.499	0.415
AIC	78.985	68.578	68.940	68.922	72.934	75.411	77.718
MSC	-0.364	0.692	0.715	0.734	0.240	-0.093	-0.265



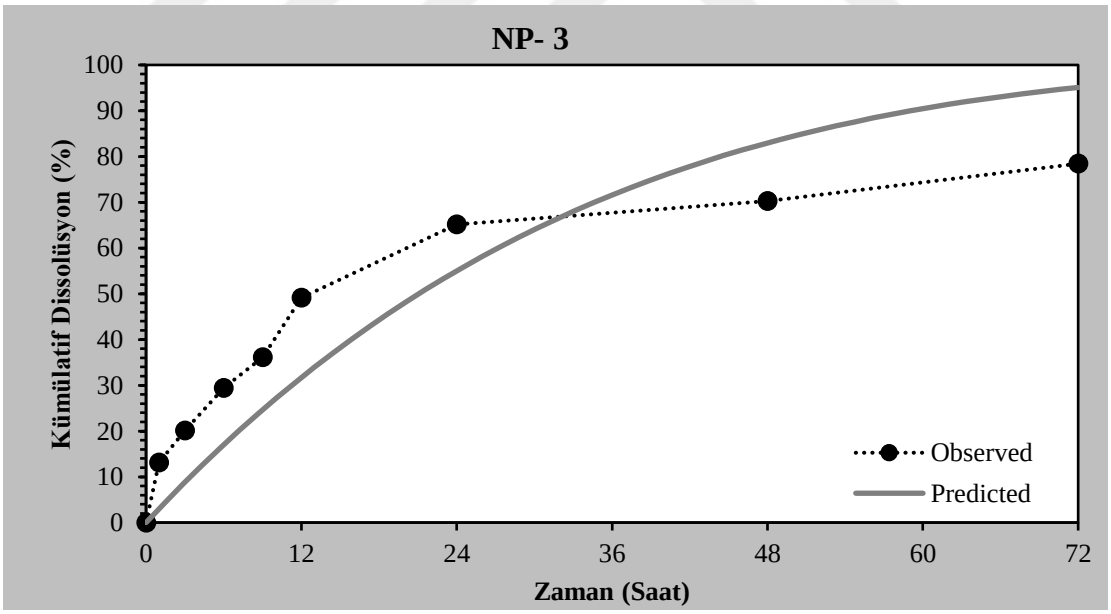
Şekil 5.73. *NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)*

Observed: *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****: Hopfenberg modeli için beklenen dissolüsyon profili*



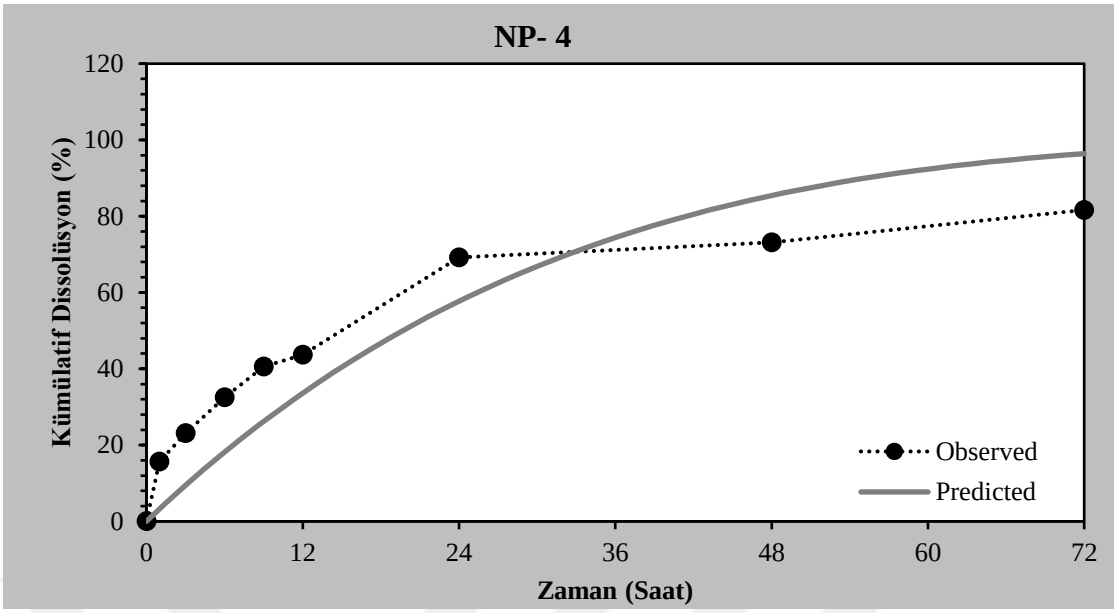
Şekil 5.74. *NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hopfenberg modeli için beklenen dissolüsyon profili*



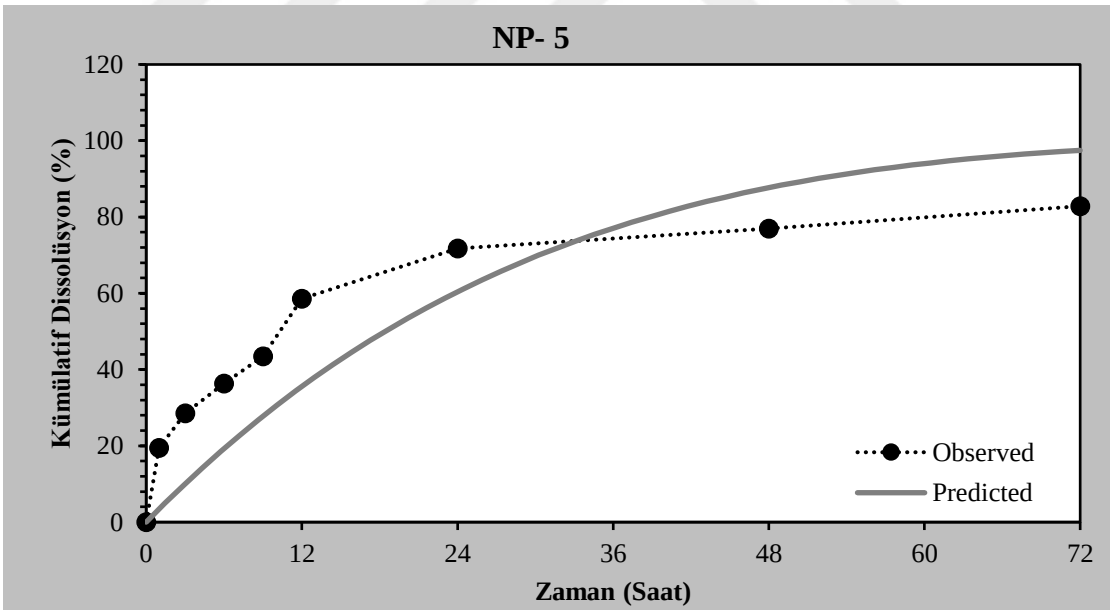
Şekil 5.75. *NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hopfenberg modeli için beklenen dissolüsyon profili*



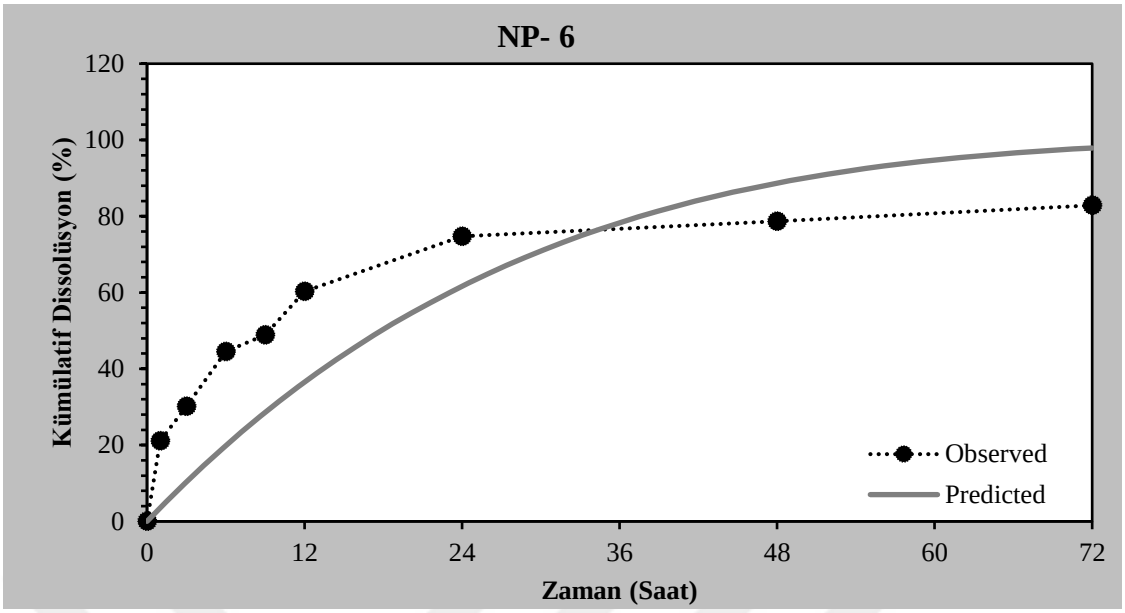
Şekil 5.76. *NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hopfenberg modeli için beklenen dissolüsyon profili*



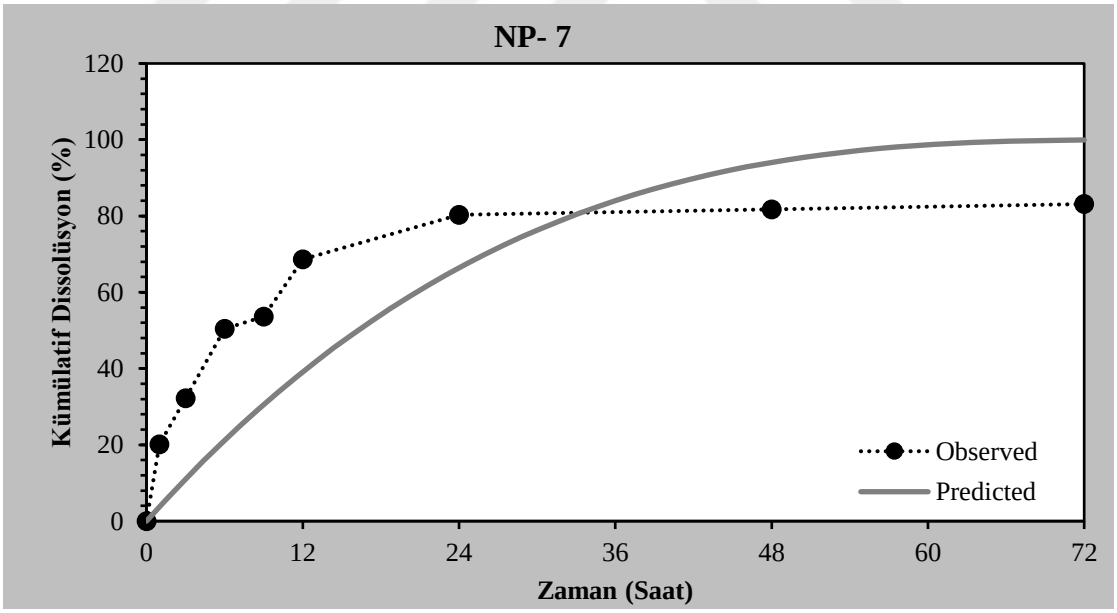
Şekil 5.77. *NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hopfenberg modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.78. *NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hopfenberg modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.79. *NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Hopfenberg Modeli)*

**__Observed:__ Elde edilen dissolüsyon profili, __Predicted__: Hopfenberg modeli için beklenen dissolüsyon profili*

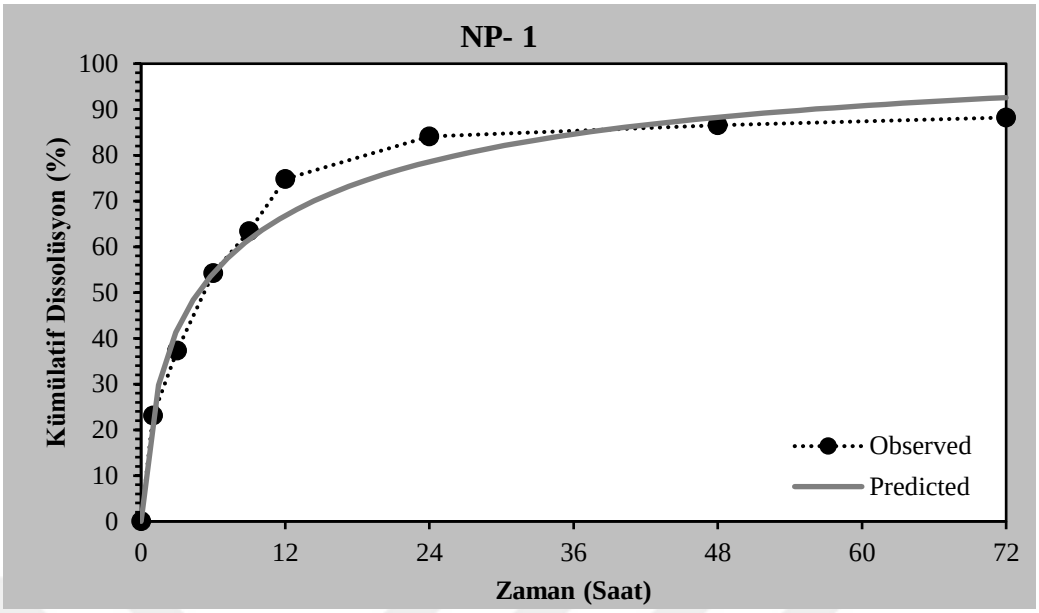
5.3.5.7. *Weibull modeli sonuçları*

Hazırlanan 7 nanopartikül formülasyonu için *in vitro* dissolüsyon çalışması verileri Weibull modeline uygulanmış ve Weibull modele ait parametreler Tablo 5.22.'de gösterilmiştir. DDSolver programından alınan Weibull modeli dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için sırasıyla Şekil 5.80., Şekil 5.81., Şekil 5.82., Şekil 5.83., Şekil 5.84., Şekil 5.85. ve Şekil 5.86.'da sunulmuştur.

Tablo 5.22. *Weibull modeli için in vitro dissolüsyon kinetiği bulguları*

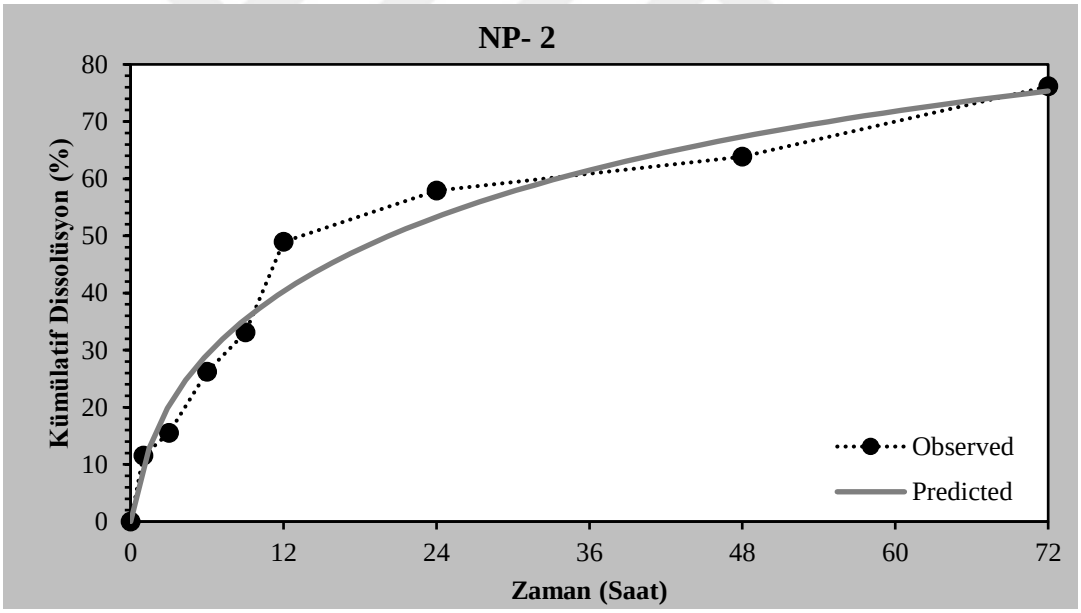
Tablo açıklamaları:** ***Rsqr: *korelasyon katsayısı (r^2),* ***Rsqr_adj:*** *düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$),* ***AIC:*** *Akaike bilgi kriteri,* ***MSC:*** *Model seçme kriteri,* ***β****: ilacın polimerik nanopartikül matrisi boyunca taşınma mekanizmasının bir parametresi*

Parametre	NP-1	NP-2	NP-3	NP-4	NP-5	NP-6	NP-7
Rsqr	0.982	0.972	0.981	0.980	0.979	0.986	0.973
Rsqr_adj	0.975	0.963	0.975	0.974	0.972	0.981	0.964
AIC	50.648	51.109	48.564	49.195	50.079	46.510	53.170
MSC	2.785	2.633	2.979	2.925	2.779	3.118	2.462
β	0.472	0.549	0.535	0.511	0.472	0.453	0.470



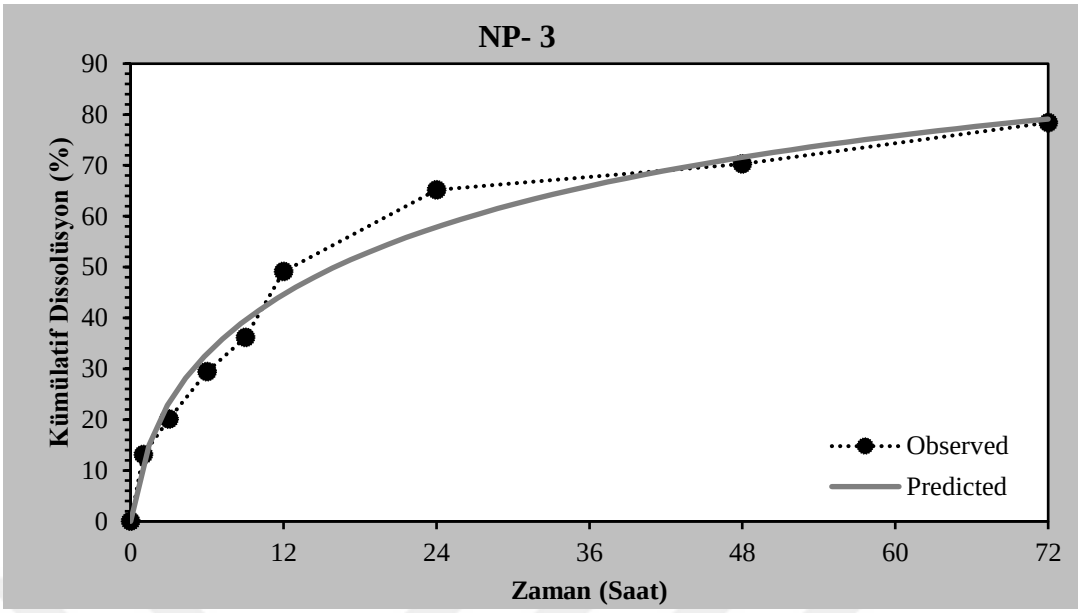
Şekil 5.80. *NP-1 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)*

Observed: *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Weibull modeli için beklenen dissolüsyon profili*



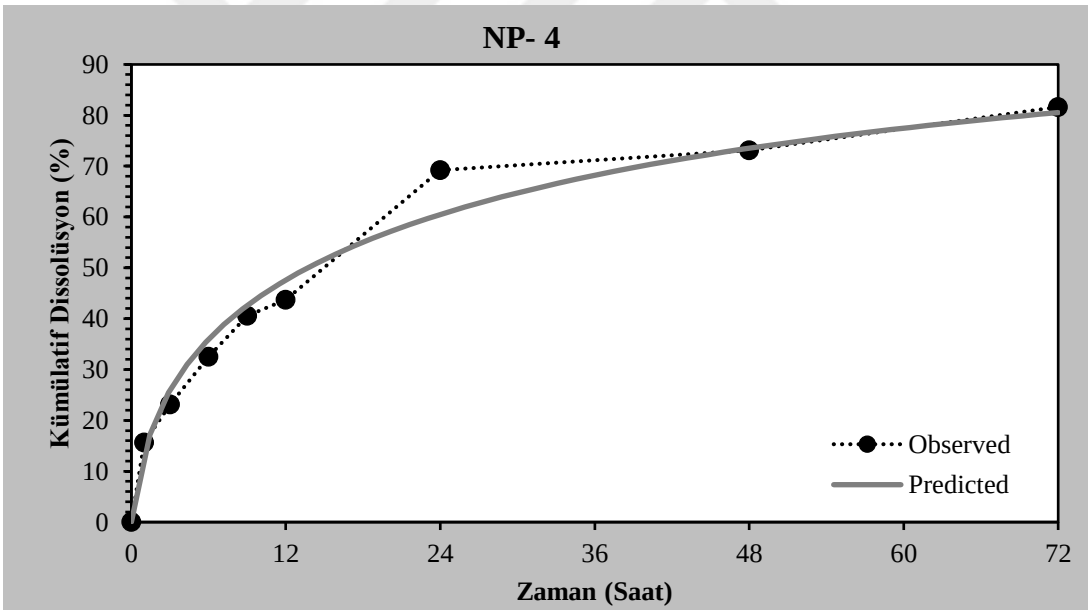
Şekil 5.81. *NP-2 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)*

Observed: *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Weibull modeli için beklenen dissolüsyon profili*



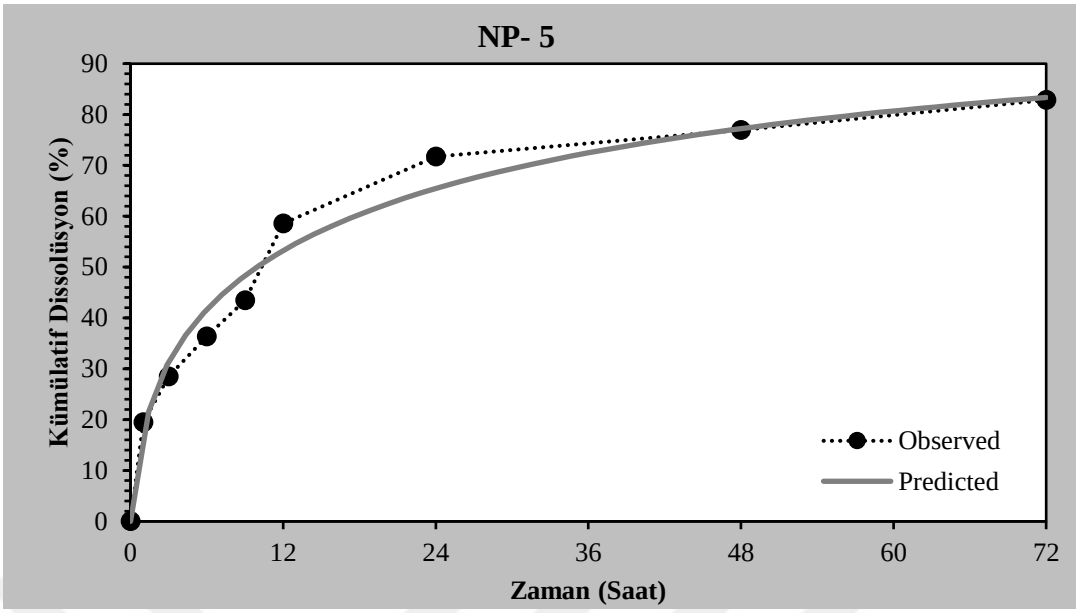
Şekil 5.82. *NP-3 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)*

****Observed:*** *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Weibull modeli için beklenen dissolüsyon profili*



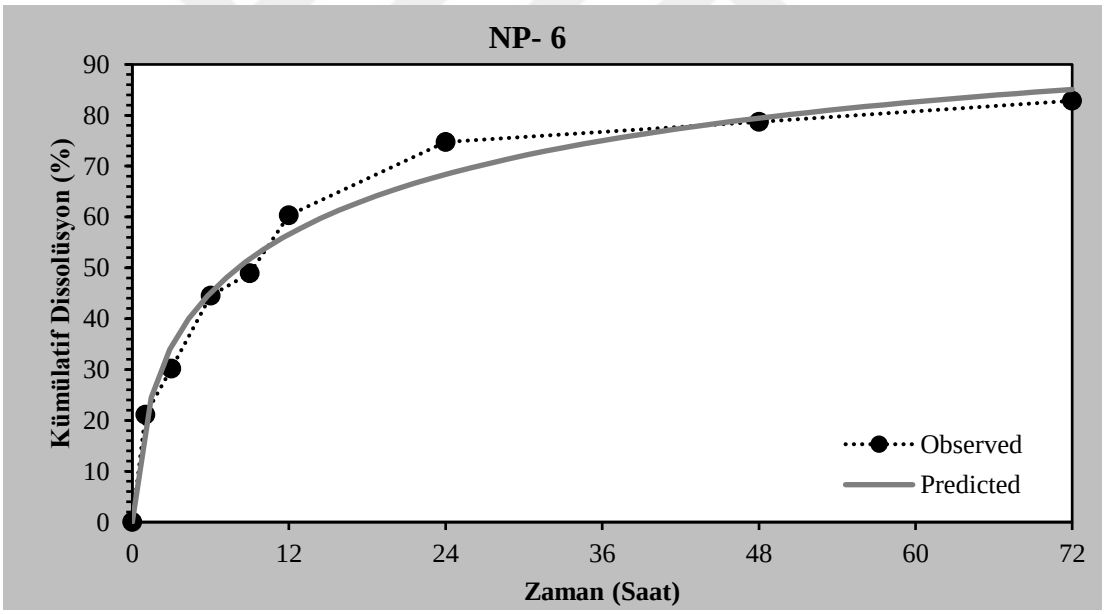
Şekil 5.83. *NP-4 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)*

****Observed:*** *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Weibull modeli için beklenen dissolüsyon profili*



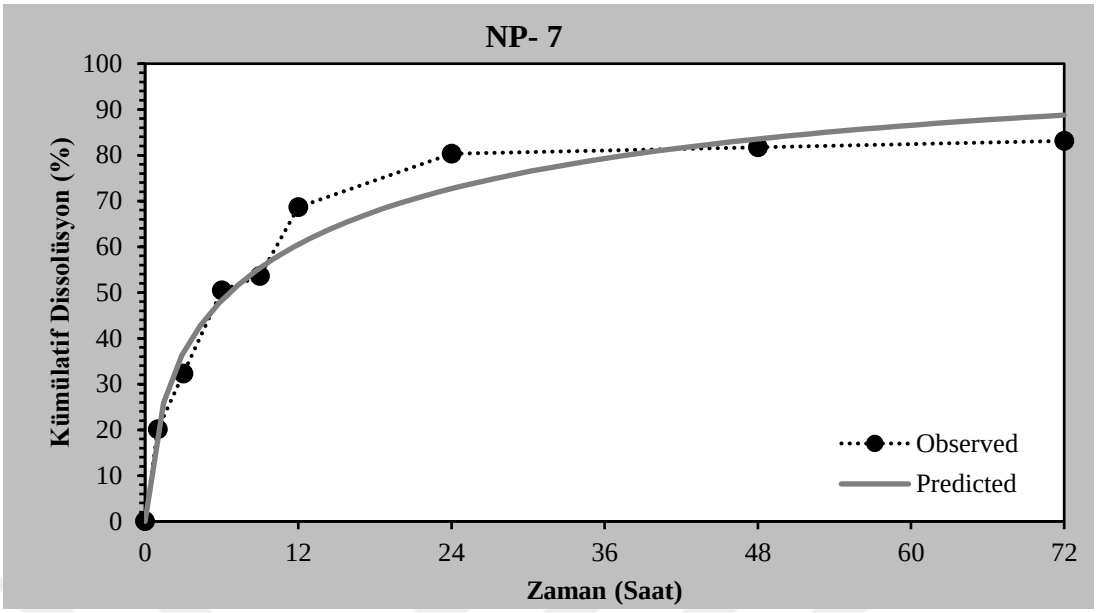
Şekil 5.84. *NP-5 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)*

Observed: *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Weibull modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.85. *NP-6 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)*

Observed: *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Weibull modeli için beklenen dissolüsyon profili*



Şekil 5.86. *NP-7 formülasyonu için karşılaştırmalı in vitro dissolüsyon kinetiği (Weibull Modeli)*

Observed: *Elde edilen dissolüsyon profili,* ***Predicted****:Weibull modeli için beklenen dissolüsyon profili*

5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

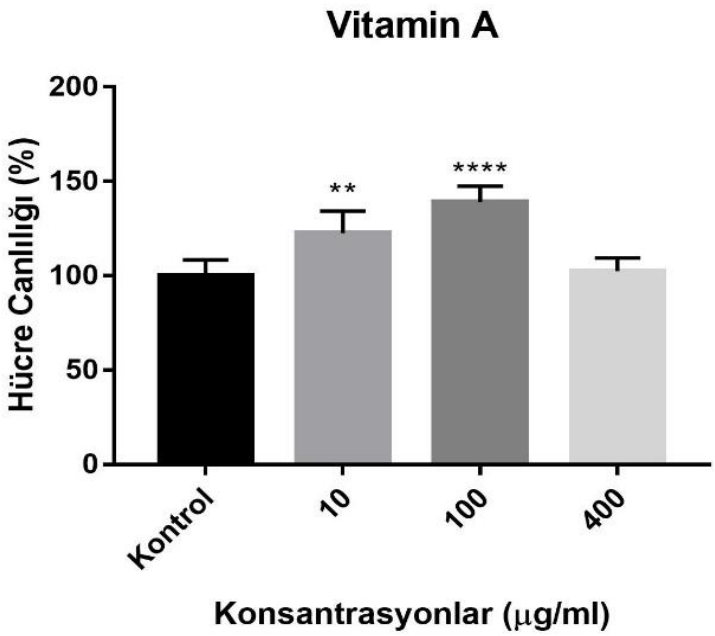
5.4.1. MTT yöntemiyle HaCaT hücrelerinde proliferasyonu artıran konsantrasyonların değerlendirilmesi

VAP, Blank-NP-1, NP-1, Blank-NP-2, NP-2, Blank-NP-3, NP-3, Blank-NP-4, NP-4, Blank-NP-5, NP-5, Blank-NP-6, NP-6, Blank-NP-7 ve NP-7'nin HaCat keratinosit hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin % değerleri Tablo 5.23.'te sunulmuştur. VAP konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.87.'de, NP-1 ve Blank-NP-1 konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.88.'de, NP-2 ve Blank-NP-2 konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.89.'da, NP-3 ve Blank-NP-3 konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.90.'da, NP-4 ve Blank-NP-4 konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.91.'de, NP-5 ve Blank-NP-5 konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine

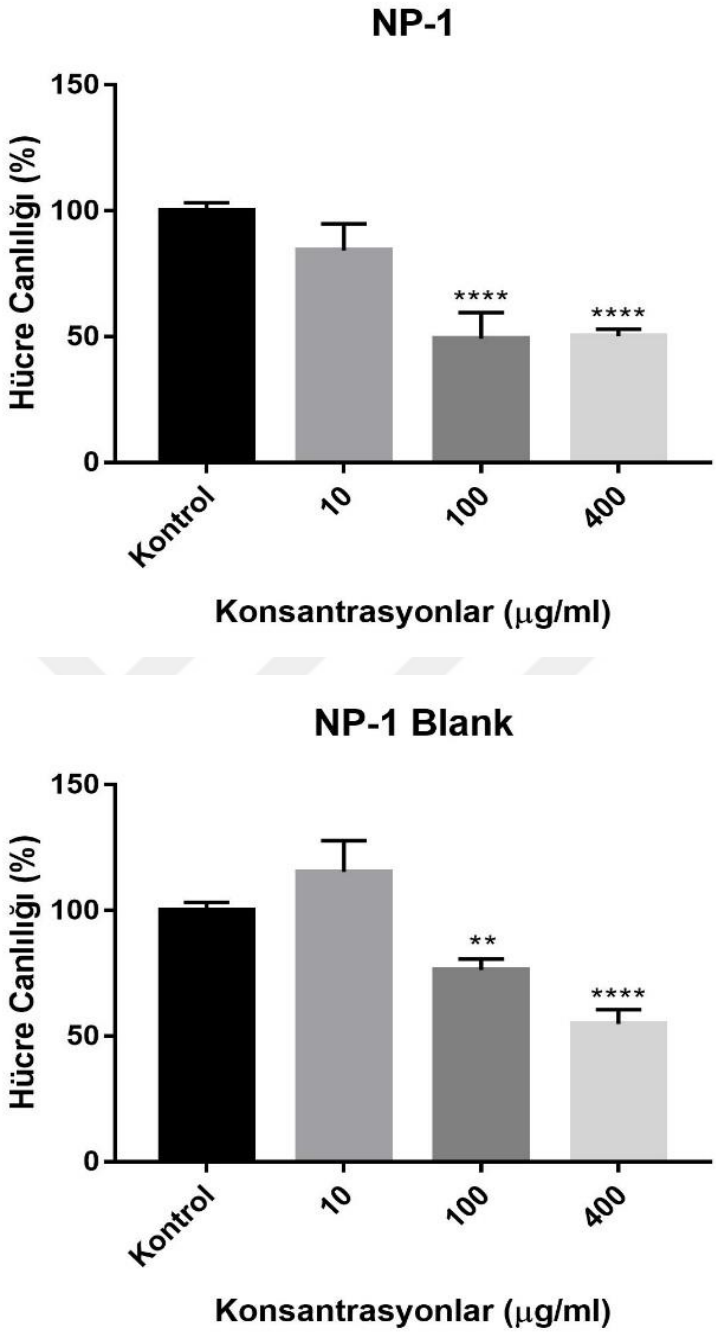
göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.92.'de, NP-6 ve Blank-NP-6 konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.93.'te, NP-7 ve Blank-NP-7 konsantrasyonlarının, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi Şekil 5.93.'te sunulmuştur. MTT deneyi sonuçlarına göre, 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} VAP konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığını 24 saatte sırasıyla % 22.59, % 39.14 ve % 2.43 oranında artırmıştır (Şekil 5.22.). Hücre canlılığındaki artış kontrol grubuna göre 10 µg.mL^{-1} ve 100 µg.mL^{-1} VAP konsantrasyonunda anlamlı bulunmuştur.

Tablo 5.23. *VAP ve hazırlanan formülasyonların HaCat keratinosit hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin % değerleri*

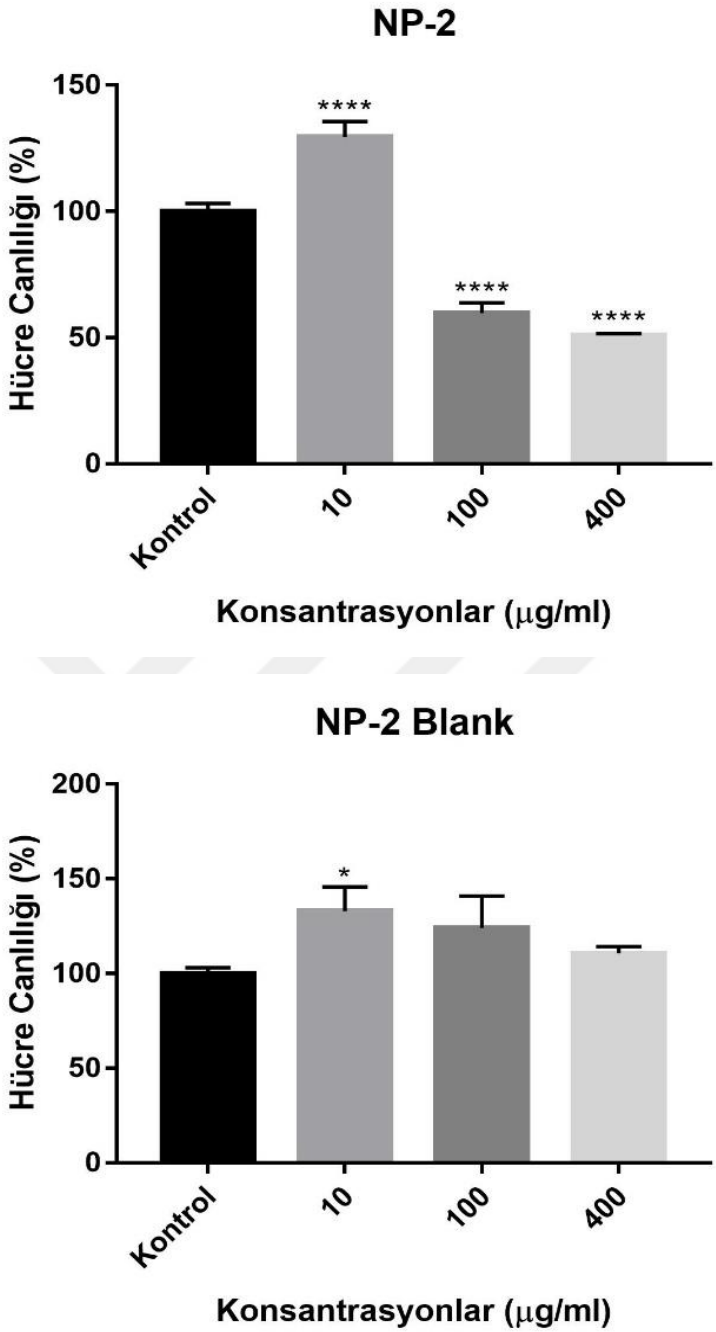
Gruplar	**Kontrol**	**10 µg.mL^{-1}**	**100 µg.mL^{-1}**	**400 µg.mL^{-1}**
VAP	100	122.59	139.14	102.43
NP-1	100	84.14	49.19	50.06
Blank-NP-1	100	115.37	76.33	54.77
NP-2	100	129.49	59.73	50.81
Blank-NP-2	100	132.96	124.16	110.78
NP-3	100	126.52	123.05	87.11
Blank-NP-3	100	97.52	55.64	48.08
NP-4	100	69.89	68.53	43.74
Blank-NP-4	100	103.35	94.42	65.30
NP-5	100	81.18	62.95	57.43
Blank-NP-5	100	115.59	101.44	79.26
NP-6	100	129.26	108.27	78.18
Blank-NP-6	100	86.81	71.10	73.62
NP-7	100	138.49	122.30	86.33
Blank-NP-7	100	112.47	79.50	72.66



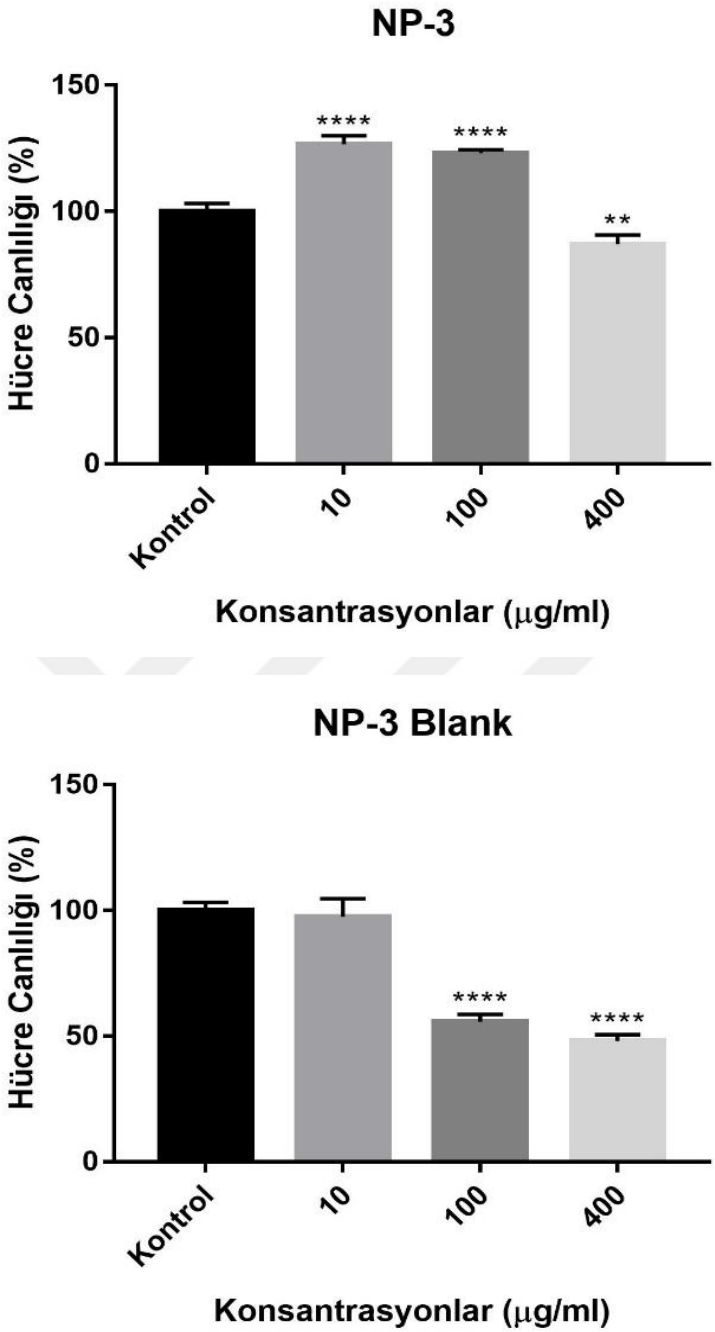
Şekil 5.87. *VAP'ın, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.01**, p<0.0001****; fark yok: p>0.05).*



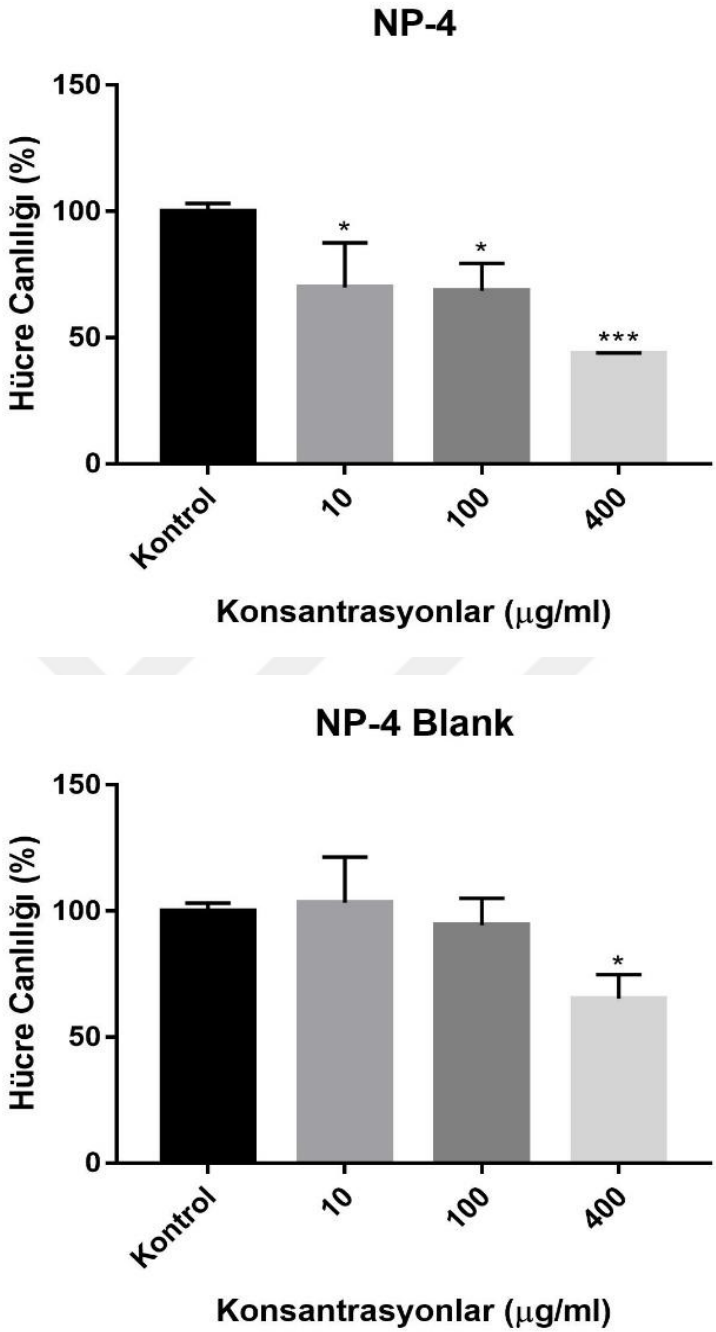
Şekil 5.88. *NP-1 ve Blank-NP-1 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.01**, p<0.0001****; fark yok: p>0.05).*



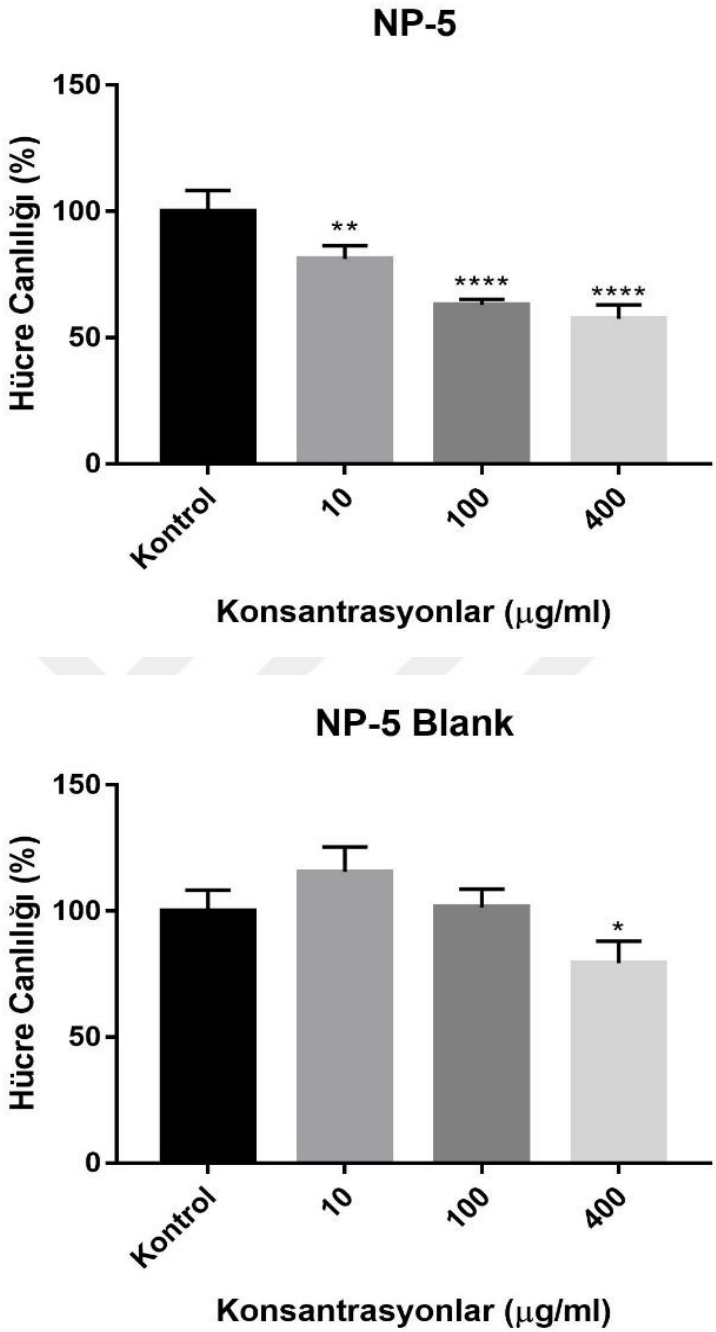
Şekil 5.89. *NP-2 ve Blank-NP-2 kodlu formülasyonların,HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.05*, p<0.0001****; fark yok: p>0.05).*



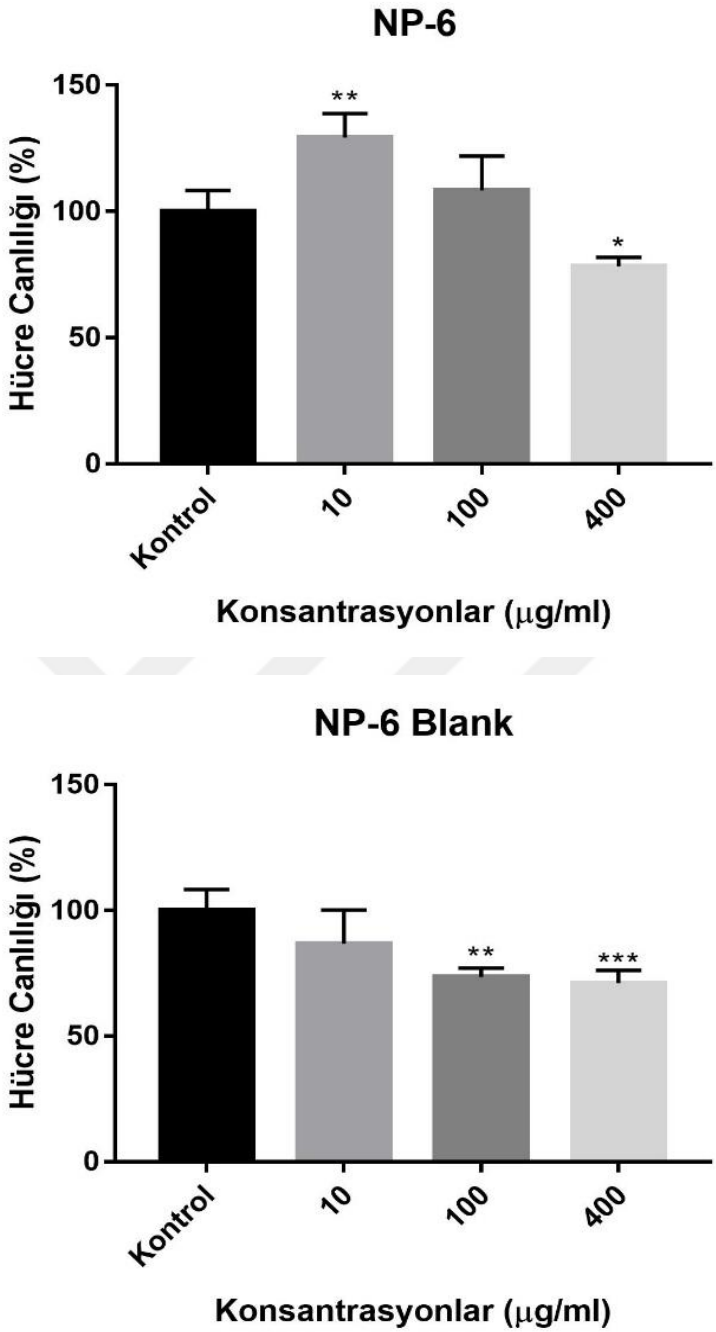
Şekil 5.90. *NP-3 ve Blank-NP-3 kodlu formülasyonların,HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.01**, p<0.0001****; fark yok: p>0.05).*



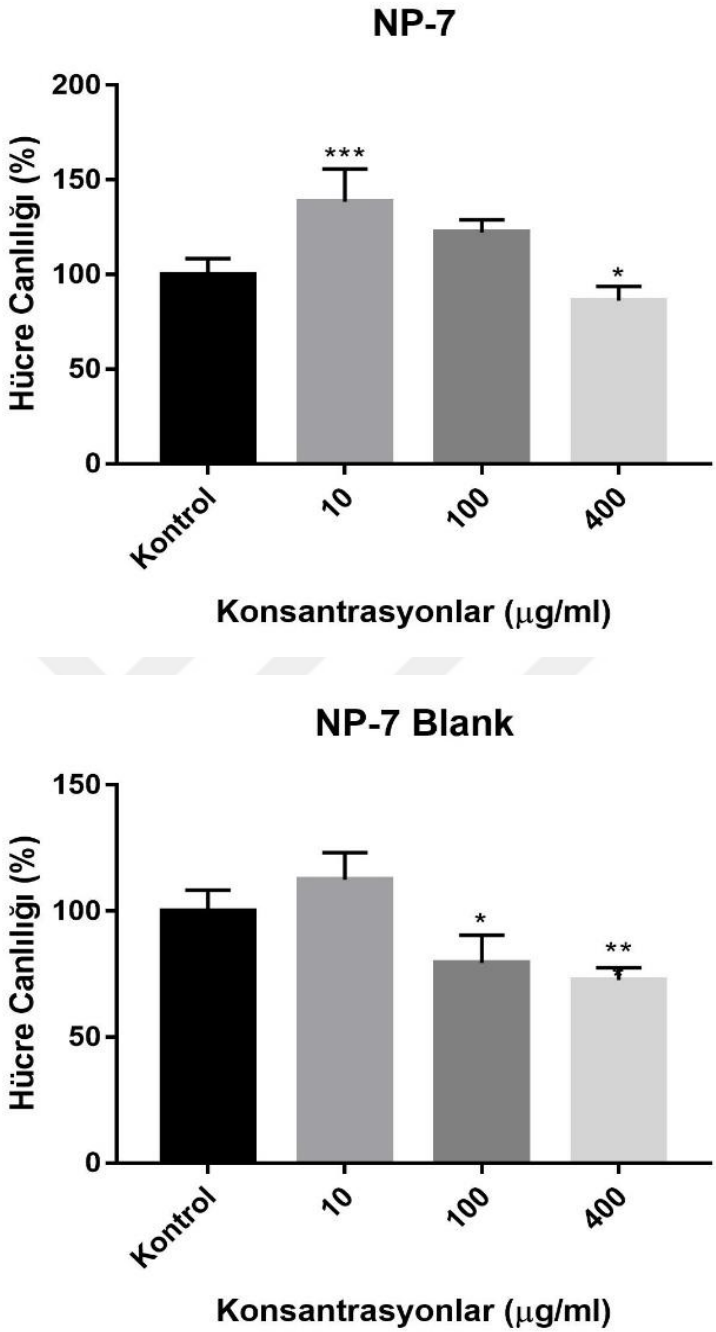
Şekil 5.91. *NP-4 ve Blank-NP-4 kodlu formülasyonların,HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.05*, p<0.001***; fark yok: p>0.05).*



Şekil 5.92. *NP-5 ve Blank-NP-5 kodlu formülasyonların,HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.05*, p<0.01**, p<0.0001****; fark yok: p>0.05).*



Şekil 5.93. *NP-6 ve Blank-NP-6 kodlu formülasyonların,HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***; fark yok: p>0.05).*

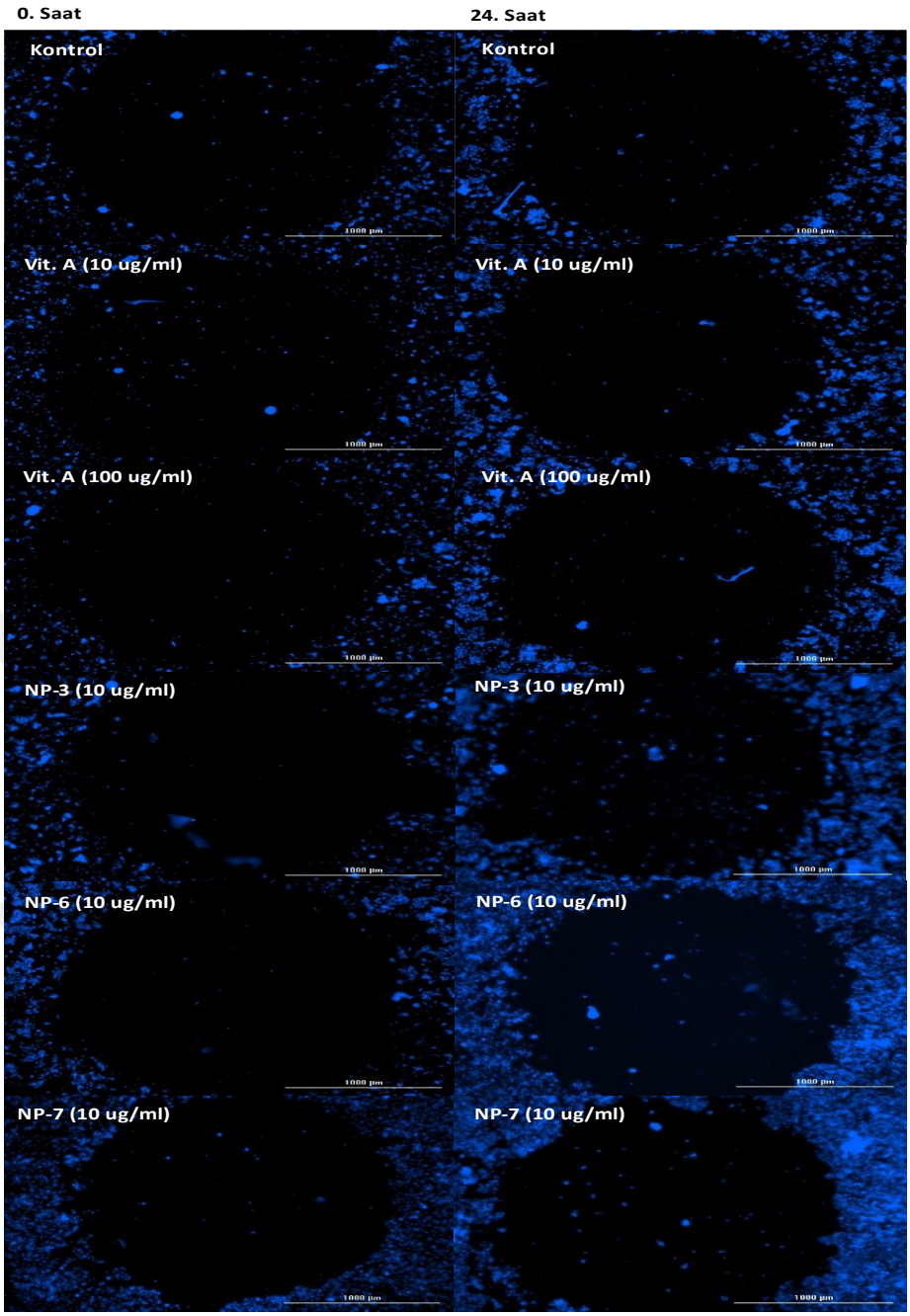


Şekil 5.94. *NP-7 ve Blank-NP-7 kodlu formülasyonların, HaCaT keratinosit hücre hattında MTT yöntemine göre belirlenen % hücre canlılık değerleri ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi (çözücü kontrol: %0.1 DMSO) (Ortalama ± Standart Sapma) (n=8) (anlamlı farklılık var: p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***; fark yok: p>0.05).*

5.5. Nanopartiküllerin Yara İyileştirici Etkilerin Belirlenmesi

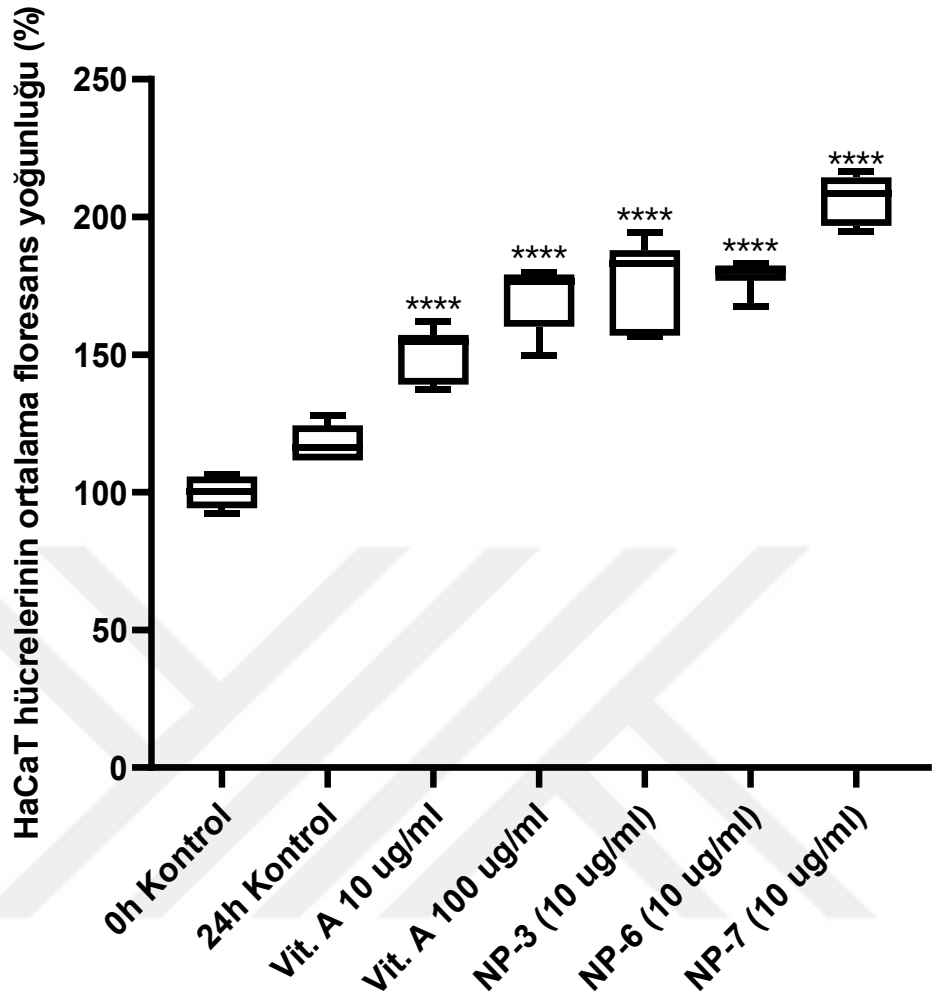
VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki görüntüleri Şekil 5.95.'te; VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki ortalama floresans yoğunluğuna göre çizilen % artış grafiği Şekil 5.96.'da; VAP, NP-3, NP-6 ve NP-7 konsantrasyonlarının yara iyileştirici etkilerinin ortalama floresans yoğunluğu % değerleri Tablo 5.24.'te sunulmuştur.

VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki görüntüleri Şekil 5.97.'de; VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki yarı çapı değişimi üzerine etkileri Şekil 5.98.'de; VAP, NP-3, NP-6 ve NP-7 konsantrasyonlarının yara çapı değişi üzerindeki etkilerinin % değerleri Tablo 5.25.'te sunulmuştur.



Şekil 5.95. *VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, 6 ve 7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki görüntüleri*

(İki bağımsız tekrardan her grup için bir temsili sonuç gösterilmektedir, objektif x20).

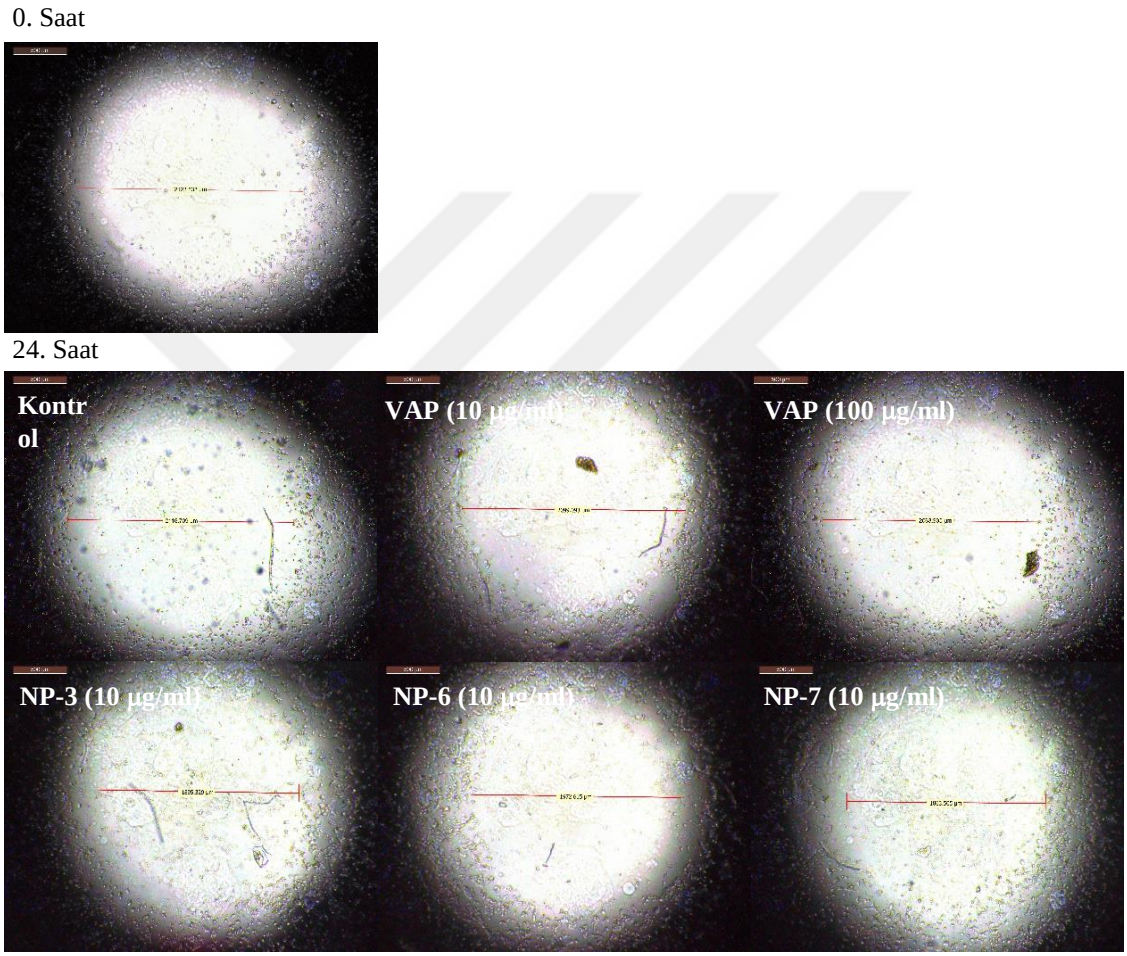


Şekil 5.96. *VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki ortalama floresans yoğunluğuna göre çizilen % artış grafiği.*

**Kutu grafiği, 0. saatte tüm gruplardan ölçülen ortalama floresans yoğunluğuna göre konsantrasyon gruplarıyla 24. saate meydana gelen yara iyileşmesini temsil etmektedir. Veriler, iki ayrı deneyin ortalama ± standart sapmalarını göstermektedir (her biri için n=3). % değerlerinin istatistiksel yönden anlamlılığını belirleyebilmek için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve ardından bir post hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır (kontrol grubuna göre; fark yok: p> 0.05; anlamlı fark: ****p < 0.0001).*

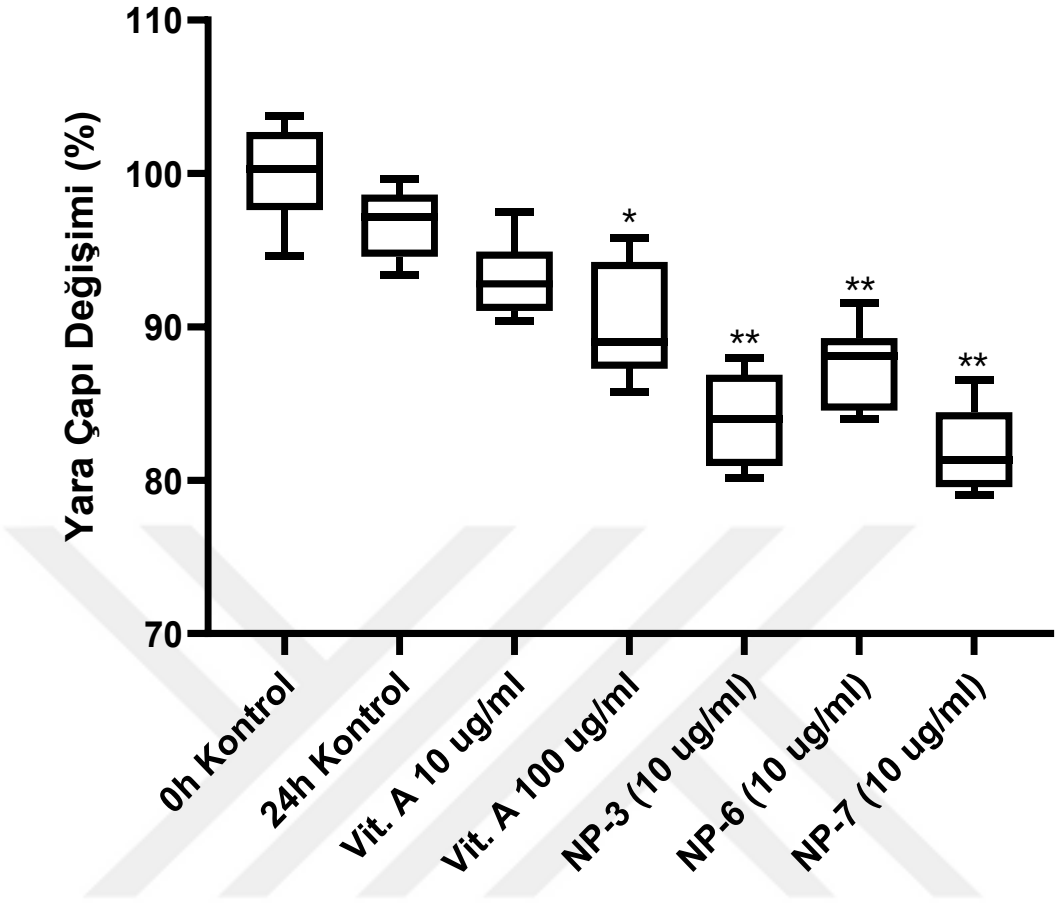
Tablo 5.24. *VAP, NP-3, NP-6 ve NP-7 konsantrasyonlarının yara iyileştirici etkilerinin ortalama floresans yoğunluğu % değerleri*

0. Saat Kontrol	24. Saat Kontrol	VAP (10 µg.mL^{-1})	VAP (100 µg.mL^{-1})	NP-3 (10 µg.mL^{-1})	NP-6 (10 µg.mL^{-1})	NP-7 (10 µg.mL^{-1})
100	117.76	150.67	170.85	176.59	179.03	206.57



Şekil 5.97. *VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki görüntüleri*

**İki bağımsız tekrardan her grup için bir temsili sonuç gösterilmektedir, ışık mikroskobu x4*



Şekil 5.98. *VAP ve VAP içeren en etkili nanopartikül formülasyonlarının (NP-3, NP-6 ve NP-7) HaCaT hücreleri üzerindeki yara iyileştirici etkilerinin 0. ve 24. saatteki yara çapı değişimi üzerine etkileri.*

**Kutu grafiği ile ifade edilen yara çapı değişimi verileri, Şekil 4'de birer örneği gösterilen fotoğraflar üzerinde mikroskobun ölçüm programı ile elde edilmiştir. Veriler, iki ayrı deneyin ortalama ± standart sapmalarını göstermektedir (her biri için n=3). % değerlerinin istatistiksel yönden anlamlılığını belirleyebilmek için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve ardından bir post hoc Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır (kontrol grubuna göre; fark yok: p> 0.05; anlamlı fark: *p < 0.05, **p < 0.01).*

Tablo 5.25. *VAP, NP-3, NP-6 ve NP-7 konsantrasyonlarının yara çapı değişi üzerindeki etkilerinin % değerleri.*

0. Saat Kontrol	24. Saat Kontrol	VAP (10 μg.mL^{-1})	VAP (100 μg.mL^{-1})	NP-3 (10 μg.mL^{-1})	NP-6 (10 μg.mL^{-1})	NP-7 (10 μg.mL^{-1})
100	96.76	93.13	90.18	83.98	87.50	81.94

6. TARTIŞMA

6.1. Analitik Miktar Tayini İçin Validasyon Çalışmaları

Bütün çalışma boyunca VAP miktar tayini için UV spektrofotometre yöntemi kullanılmıştır. Tüm çalışmanın validasyon sonuçları '6.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması' ve '6.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması' isimli bölümlerde tartışılmıştır.

6.1.1. Vitamin A palmitat için 1:1 etanol: aseton ortamında validasyon çalışması

Enkapsülasyon etkinliği çalışmasından önce, VAP için spesifik ve seçici bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. UV yöntemi, UV/VIS Kayıt Spektrofotometresi (UV-160A, Shimadzu, Japonya) üzerinde 330 nm'de ve kuvars hücre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada VAP için kullanılan UV spektrofotometrik yöntem doğrusallık, kesinlik ve doğruluk için doğrulanmıştır. Standart çözelti için, doğru bir şekilde tartılan 25 mg VAP, 25 mL'lik ölçülü balona aktarılmış ve etanol: aseton (1:1) içinde çözülmüştür (nihai konsantrasyon 1000 $\mu g.mL^{-1}$). Kalibrasyon eğrisi, standart çözeltinin (2 -10 $\mu g.mL^{-1}$) 6 konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Çözeltiler üç kopya halinde hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Doğrusallık, en küçük kareler regresyon yöntemi ile hesaplanan doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) ile belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik, numunelerin aynı konsantrasyonda ve aynı gün içinde analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Ara kesinlik, farklı günlerdeki (3 gün) testler karşılaştırılarak incelenmiştir (Mendez vd., 2003). Her konsantrasyon için üç numune solüsyonu (4 $\mu g.mL^{-1}$, 6 $\mu g.mL^{-1}$, 10 $\mu g.mL^{-1}$) hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Doğruluk, işlemin başında numunelere eklenen bilinen miktarlarda VAP referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir (Battaglia & Ugazio, 2019). Bu amaçla, doğru bir şekilde tartılmış 10 mg VAP 100 mL'lik ölçülü balona aktarıldı ve etanol: etanol (1:1) (son konsantrasyon 100 $\mu g.mL^{-1}$) içinde çözülmüştür. Bu çözeltiden doğruluk çalışması için 4, 6 ve 10 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.

Vitamin A palmitatın miktar tayininde kullanılan UV spektrofotometre yöntemi için yapılan doğrusallık çalışması sonucunda determinasyon katsayısı (r^2) 0.9992 olarak bulunmuş ve miktar tayininin doğrusallığı kanıtlanmıştır (Bkz. Tablo 5.1. ve Bkz. Şekil 5.1.). Kesinlik çalışmaları 3 gün sürmüş ve analizler sonunda yöntemin tekrar

eldeedilebilirliği ve tekrarlanabilirliği için varyasyon katsayısının %2'nin altında bulunması yöntemin kesinliğini göstermiştir. Üç farklı derişim ile yapılan doğruluk ve geri elde edilebilirlik çalışmasında elde edilen veriler ile de yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır (Bkz. Tablo 5.5.) (Borman ve Elder, 2017).

6.1.2. Vitamin A palmitat için %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 ortamında validasyon çalışması

In vitro dissolüsyon çalışmasından önce, VAP için spesifik ve seçici bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. UV yöntemi, UV/VIS Kayıt Spektrofotometresi (UV-160A, Shimadzu, Japonya) üzerinde 330 nm'de ve kuvars hücre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada VAP için kullanılan UV spektrofotometrik yöntem doğrusallık, kesinlik ve doğruluk için doğrulanmıştır. Standart çözelti için, doğru bir şekilde tartılan 25 mg VAP, 25 mL'lik ölçülü balona aktarılmış ve %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 içinde çözülmüştür (nihai konsantrasyon 1000 $\mu g.mL^{-1}$). Kalibrasyon eğrisi, standart çözeltinin (2 -10 $\mu g.mL^{-1}$) 6 konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Çözeltiler üç kopya halinde hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Doğrusallık, en küçük kareler regresyon yöntemi ile hesaplanan doğrusal regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın kesinliği, tekrarlanabilirlik (gün içi) ve ara kesinlik (günler arası) ile belirlenmiştir. Tekrarlanabilirlik, numunelerin aynı konsantrasyonda ve aynı gün içinde analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Ara kesinlik, farklı günlerdeki (3 gün) testler karşılaştırılarak incelenmiştir (Mendez et al., 2003). Her konsantrasyon için üç numune solüsyonu (4 $\mu g.mL^{-1}$, 6 $\mu g.mL^{-1}$, 10 $\mu g.mL^{-1}$) hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Doğruluk, işlemin başında numunelere eklenen bilinen miktarlarda VAP referans standardının geri kazanılmasıyla belirlenmiştir (Battaglia & Ugazio, 2019). Bu amaçla, doğru bir şekilde tartılmış 10 mg VAP 100 mL'lik ölçülü balona aktarıldı ve %1 Tween 80 içeren PBS pH 6.8 (son konsantrasyon 100 $\mu g.mL^{-1}$) içinde çözülmüştür. Bu çözeltiden doğruluk çalışması için 4, 6 ve 10 $\mu g.mL^{-1}$ konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanmıştır.

VAP miktar tayininde dissolüsyon çalışmasında kullanılan UV spektrofotometre yöntemi için yapılan doğrusallık çalışması sonucunda determinasyon katsayısı (r^2) 0.9990 olarak bulunmuş ve miktar tayininin doğrusallığı kanıtlanmıştır (Bkz. Tablo 5.6. ve Bkz. Şekil 5.2.). 3 gün süren kesinlik çalışmaları sonucu yöntemin tekrar eldeedilebilirliği ve tekrarlanabilirliği için varyasyon katsayısının %2'nin altında bulunması yöntemin kesinliğini göstermiştir (Bkz. Tablo 5.7., Tablo 5.8. ve Tablo 5.9.). Üç farklı derişim ile

yapılan doğruluk ve geri eldeedilebilirlik çalışmasında elde edilen veriler ile de yöntemin doğruluğu kanıtlanmıştır (Bkz. Tablo 5.10.) (Borman ve Elder, 2017).

6.2. Çalışma Koşulunda Kararlılık

Formülasyon hazırlama koşulunda kararlılık çalışmasında VAP % geri kazanım sonuçları Ortalama ± Standart sapma olarak, 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 çözeltisi, 10 mL, %0.2'lik kitosan çözeltisi, 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.2'lik kitosan çözeltisi, 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.1'lik kitosan çözeltisi, 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.05'lik kitosan çözeltisi, 10 mL, %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.025'lik kitosan çözeltisi, 10 mL ve %0.5'lik Pluronic F-68 içeren %0.0125'lik kitosan çözeltisi ortamlarında sırasıyla % 99.02 ± 0.74, % 98.64 ± 1.04, % 99.71 ± 0.03, % 99.16 ± 0.80, % 98.19 ± 1.18, % 98. 02 ± 1.62 ve % 99.21 ± 0.53 olarak elde edilmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği tayini analizi için örnek hazırlama koşulunda kararlılık çalışmasında VAP % geri kazanım sonuçları Ortalama ± Standart sapma olarak %98.82 ± 0.95 olarak elde edilmiştir.

In vitro dissolüsyon ortamı koşulunda kararlılık çalışmasında VAP % geri kazanım sonuçları Ortalama ± Standart sapma olarak 98.96 ± 1.03 olarak elde edilmiştir.

Tüm çalışma ortamında kararlılık sonuçları değerlendirildiğinde yüksek % geri kazanım oranları çalışmada kullanılan tüm koşulların uygun olduğunu göstermiştir (Öztürk, 2017).

6.3. Formülasyonların Hazırlanması

6.4. Vitamin A Palmitat Yüklü Nanopartikül Formülasyonlarının Karakterizasyonu

6.4.1. Parçacık boyutu ve parçacık boyutu dağılımı

Parçacık boyutu ve parçacık boyut dağılımı, nanopartiküllerin iki önemli kriteridir, çünkü bu faktörler ilaç dissolüsyon hızı, muko-adezyon, biyolojik dağılım, hücresel alım vb. özellikleri etkiler. Farmakolojik etkiyi ve klinik sonuçları optimize etmek için dar boyut dağılımına sahip nanopartiküller gereklidir (Öztürk vd., 2018).

Parçacık boyut sonuçları, Blank-NP-1, NP-1, Blank-NP-2, NP-2, Blank-NP-3, NP-3, Blank-NP-4, NP-4, Blank-NP-5, NP-5, Blank-NP-6, NP-6, Blank-NP-7 ve NP-7 için sırasıyla 181.77 nm ± 2.38, 196.33 nm ± 0.65, 559.63 nm ± 4.08, 669.23 nm ± 5.49,

528.63 nm ± 2.50, 548.43 nm ± 5.94, 506.70 nm ± 1.56, 534.50 nm ± 3.78, 475.97 nm ± 1.87, 480.87 nm ± 2.70, 443.40 nm ± 3.70, 469.07 nm ± 2.37, 353.90 nm ± 6.37 ve 413.60 nm ± 5.77 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.12.). Parçacık boyutu analizinde ilk dikkat çeken, VAP yüklenmiş nanopartiküllerin blank/boş formülasyonlardan daha büyük bir parçacık boyutuna sahip olmasıdır. Daha önceki çalışmalar incelendiğinde, ilaç yüklü nanopartikül formülasyonlarının parçacık boyutunun blank/boş formülasyonlardan daha büyük olabileceği bildirilmiştir (Ekambaram ve Sathali, 2011; Öztürk vd., 2019). Bunun nedeni, polimer gibi maddelerin etkin maddeyi kapsülleyerek partikülü oluşturması ve dolayısıyla partikül boyutunda büyüme olabilmesi şeklinde açıklanabilmektedir.

Parçacık boyutu analizlerinde dikkat çeken bir diğer nokta kitosan ile modifiye nanopartiküllerin (NP-2, NP-3, NP-4, NP-5 NP-6, NP-7 ve blank formülasyonları) parçacık boyutları, sadece PLGA ile hazırlanana (Balnk-NP-1 ve NP-1) kıyasla arttığı gözlenmiştir. Ayrıca kitosan modifiye NP-2, NP-3, NP-4, NP-5 NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar kendi içlerinde incelendiğinde parçacık boyutlarında NP-2 >NP-3 > NP-4 > NP-5 > NP-6 > NP-7 olarak bir sıralama gözlenmiştir. Bilindiği üzere NP-2, NP-3, NP-4, NP-5 NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların kitosan ile modifiye etmek için sırasıyla %0.2, %0.2, %0.1, %0.05, 0.025, %0.0125'lik kitosan çözeltisi kullanılmış ve kitosan konsantrasyonun azalması ile parçacık boyutu değeri düşmüştür. Bu durum, manyetik karıştırıcıda emülsiyonun karıştırılması sırasında kayma gerilimini azaltan ve daha sonra emülsiyon damlacıklarının parçacık boyutunda bir artışa yol açan kitosan ile ilişkili viskozite artışı nedeniyle açıklanabilmektedir (Lima vd., 2018). Benzer sonuçlar literatürde de bulunmaktadır (Durán-Lobato vd., 2015; Martín-Banderas vd., 2012).

Parçacık boyutu dağılımı (PDI) sonuçları, Blank-NP-1, NP-1, Blank-NP-2, NP-2, Blank-NP-3, NP-3, Blank-NP-4, NP-4, Blank-NP-5, NP-5, Blank-NP-6, NP-6, Blank-NP-7 ve NP-7 için sırasıyla 0.12 ± 0.03, 0.11 ± 0.04, 0.21 ± 0.02, 0.37 ± 0.06, 0.16 ± 0.03, 0.30 ± 0.04, 0.34 ± 0.03, 0.37 ± 0.04, 0.27 ± 0.01, 0.21 ± 0.03, 0.21 ± 0.05, 0.24 ± 0.02, 0.15 ± 0.03 ve 0.20 ± 0.01 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.12.). Belirli bir nanosistemde parçacık boyutu dağılımının homojenliği hakkında bilgi veren bir oran olan PDI, 0.0-1.0 aralığında nanopartikül dispersiyonunun kalitesini yansıtır. PDI değerinin 0.1'den küçük olması yüksek dispersiyon kalitesini gösterir ve parçacık boyutunun neredeyse tüm partiküllerde eş olduğunu gösterir. Çoğu araştırmacı hazırlanan nanopartikül sistemlerde PDI değerlerinin 0.3'ten küçük olmasını optimum değer olarak kabul etmektedir; ancak, 0.5'ten küçük değerler de kabul edilebilir olduğu literatürde

birçok çalışmada bildirilmiştir (Büyükköroğlu vd., 2016). Literatüre göre, sonuç olarak bu tezde hazırlanan PLGA nanopartikülleri (Blank-NP-1 ve NP-1) ve kitosan kaplı PLGA nanopartiküllerin (NP-2, NP-3, NP-4, NP-5 NP-6, NP-7 ve blank formülasyonları) kaliteli ve monodispers olarak hazırlandığı sonucuna varılabilir.

6.4.2. Zeta potansiyel

Kitosan ile kaplanmamış PLGA nanopartiküllerinde (Blank-NP-1 ve NP-1) negatif zeta potansiyel değerleri gözlenmiştir (Bkz. Tablo 5.13.). Zeta potansiyel, Blank-NP-1 kodlu nanopartikül de ve VAP yüklü NP-1 kodlu nanopartikülde sırasıyla -15.47 ± 0.23 mV ve -15.60 ± 0.44 mV olarak belirlenmiştir. Nötr ortamdaki PLGA, terminal karboksil gruplarından dolayı negatif yüzey potansiyeline sahiptir ve bu, kitosan ile kaplanmamış PLGA nanopartiküllerinde elde edilen negatif zeta potansiyeli açıklar niteliktedir (Lima vd., 2018). Zeta potansiyel değeri olarak +/- 30 mV olan bir koloidal sistem, bir sıvıda koloidal bir dispersiyon olarak dağılmışsa kararlı bir formülasyon olarak kabul edilmektedir (Emami vd., 2015; Öztürk vd., 2019). -5.0 ve -15.0 mV arasındaki zeta potansiyel değerleri bir nanosistem için flokülasyonun sınır bölgesindedir; ve -5.0 ile -3.0 mV arasındaki değerler bir nanosistem için ise maksimum flokülasyon bölgesi olduğu daha önce bildirilmiştir (Müller vd., 2000). Blank-NP-1 ve NP-1 kodlu formülasyonlar için sonuçlar incelendiğinde zeta potansiyel değerlerinin flokülasyon sınırının az üstünde olduğu görülmektedir. Bu, Blank-NP-1 ve NP-1 kodlu PLGA nanopartikül formülasyonlarının kararlılığını göstermektedir.

Kitosan ile yüzey modifiye edilmiş formülasyonlarda (NP-2, NP-3, NP-4, NP-5 NP-6, NP-7 ve blank formülasyonları) nanopartiküllerin zeta potansiyel değerleri pozitif değerlere ulaşmıştır (Bkz. Tablo 5.13.). Zeta potansiyel, Blank-NP-2, NP-2, Blank-NP-3, NP-3, Blank-NP-4, NP-4, Blank-NP-5, NP-5, Blank-NP-6, NP-6, Blank-NP-7 ve NP-7 için sırasıyla +39.07 ± 3.04, +36.33 ± 0.57 mV, +39.67 ± 0.96 mV, +30.67 ± 1.10 mV, +45.63 ± 0.40 mV, +46.13 ± 0.70 mV, +47.67 ± 0.51 mV, +48.50 ±1.85 mV, +52.27 ± 0.9 mV, +52.47 ± 1.23 mV, +47.03 ± 0.87 mV ve +45.43 ± 1.34 mV olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kitosanda bulunan amino gruplarının bir sonucudur ve PLGA nanopartiküllerinin kitosan tarafından yeterince kaplandığını göstermektedir (Öztürk vd., 2019).

6.4.3. Enkapsülasyon etkinliği

Enkapsülayon etkinliği sonuçları NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5 NP-6 ve NP-7 için sırasıyla %74.69 ± 4.04, %77.86 ± 2.53, %78.64 ± 6.44, %81.28 ± 2.80, %85.18 ± 0.58, %84.78 ± 2.91 ve %83.87 ± 2.73 olarak belirlenmiştir. Elde edilen hem PLGA nanopartikülü hem de kitosan kaplı PLGA nanopartikülleri için yüksek enkapsülasyon etkinliği değerleri, muhtemelen VAP'ın su fazına düşük ilgisi ve dolayısıyla organik faza göç etme eğiliminde olan lipofilik yapısından kaynaklanmaktadır (Durán-Lobato vd., 2015). Nanosistemlere yüklenen/enkapsüle edilen aktif madde içeriği, formülasyonlarda önemli bir faktördür çünkü daha yüksek yükleme, belirli bir doz için daha düşük miktarda nanosistem kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Öztürk vd., 2018). Elde edilen yüksek enkapsülasyon oranları çalışmada hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının daha düşük miktarda kullanabileceğini kanıtlamaktadır.

6.4.4. *In vitro* dissolüsyon

VAP ve bir A vitamini türevi olan retinil asetat ile yapılan bir dissolüsyon çalışmasında, 50 ve 75 rpm olmak üzere iki farklı dönüş hızı, USP Aparat 2 ve 900 ml çözünme ortamı koşulları kullanılmıştır. Çözünme ortamı olarak %1 oktoksinol-9 ve %1 sodyum l-askorbat içeren pH 6.8 fosfat tamponu kullanılmıştır. 50 rpm'de gerçekleştirilen dissolüsyon deneyleri A vitamininin eksik çözündüğünü göstermiş, bu da 50 rpm karıştırma hızının karıştırmanın tatmin edici olmadığını şeklinde yorumlanmıştır. Daha yüksek miktarda çözünmüş A vitamini, karıştırma hızının 75 rpm'e yükseltilerek elde edilmiştir. Üç farklı firma tarafından temin edilmiş VAP numuneleri, 45 dakika içinde %54, %37 ve %102 oranında dissolüsyon göstermiştir (Davydova ve d., 2010).

VAP yüklü nanoemülsiyonların hazırlandığı bir çalışmada optimize edilmiş nanoemülsiyon sistemlerde VAP'ın *in vitro* difüzyon oranı, diyaliz torbası yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Dissolüsyon ortamı olarak fosfat tamponu (pH 7.4) seçilmiştir ve çalışma 24 saat boyunca devam ettirilmiştir. Çalışmada nanoemülsiyon formülasyonlarından VAP dissolüsyonu, saf VAP'ın sulu dispersiyonu ile karşılaştırılmıştır. Nanoemülsiyon formülasyonlarından VAP dissolüsyonu, saf VAP'ın sulu dispersiyonundan önemli ölçüde daha yüksek olarak bulunmuştur. Spesifik olarak, nanoemülsiyon sistemlerinden VAP dissolüsyonu, 24 saat içinde sulu dispersiyondan %9.89 ile karşılaştırıldığında %89-94 aralığında elde edilmiştir. Ayrıca hazırlanan sistemler kendi aralarında kıyaslandığında daha küçük ortalama damlacık boyutundan dolayı maksimum VAP salımı olduğu belirlenmiştir (Algahtani vd., 2020).

VAP yüklü fiberlerin hazırlandığı bir çalışmada dissolüsyon deneyleri, termostatik çalkalama inkübatöründe, 37°C ve 100 rpm koşullarında gerçekleştirilmiştir. Fiber numunelerinin dissolüsyon ortamı için 30 mL %0.5 (*h/h*) Tween 80 içeren PBS (pH 7.4) tercih edilmiştir. İlgili ortam ve koşullarda VAP dissolüsyonu, ilk 8 saat boyunca %20'lik bir ilk patlama dissolüsyonu göstermiş ardından 50 saatten fazla bir süre boyunca kademeli olarak salınmıştır. 60 saat sonunda VAP'ın dissolüsyonu yaklaşık %64 olmuş ve platoya ulaşmıştır. VAP'ın gözlemlenen ilk hızlı dissolüsyonu, liflerin yüzeyinde bir miktar VAP varlığından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Li vd., 2016).

VAP yüklü nanofiberlerin hazırlandığı başka bir çalışmada VAP *in vitro* dissolüsyonu, simüle edilmiş mide (pH=1.2) ve bağırsak (pH=6.8) sıvılarında incelenmiştir. Diyaliz tüpüne aktarılan nanofiberler 100 rpm 37°C'de sürekli karıştırılarak mide sıvısı çözeltisine 2 saat daldırılmış ardından diyaliz tüpü daha sonra bağırsak sıvısına daldırılmış ve 6 saat boyunca deney devam ettirilmiştir. 500 dakika sonucunda yaklaşık %20 oranında VAP dissolüsyonu olduğu gözlenmiştir (Fahami ve Fathi, 2018).

VAP yüklü etozomların *in vitro* dissolüsyou gerçekleştirildiği bir çalışmada USP 1 çözünme aparatı kullanılmıştır. Dissolüsyon ortamı olarak %1 Tween 20 içeren 100 mL fosfat tamponu pH 5.5 tercih edilmiş ve 100 rpm'de sürekli karıştırılarak 37± 0.5°C'de dissolüsyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Serbest VAP süspansiyonundan serbest bırakma şeklinin hızlı olduğu ve VAP'ın yaklaşık %56'sının ilk 3 saatte serbest bırakıldığı gözlemlenmiştir. Buna karşılık, etozomlardaki VAP, yaklaşık %26.29 ila %48.54 gibi değişik oranlarda yavaş ve kontrollü bir dissolüsyon göstermiştir. 24 saat içinde salınan VAP'ın etosomal formülasyonlarından elde edilen *in vitro* dissolüsyon çalışması sonuçları, %62.48 ± 8.54 ila %97.9 ± 3.92 arasında değişmiştir. Süspansiyondan salınan VAP yüzdesi, etozomlardan salınan VAP yüzdesinden daha yüksek elde edilmiş; bu durum, etozomdan VAP salınımını geciktiren veziküler sistemin rezervuar etkisine bağlı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Salem vd., 2021).

VAP yüklü katı lipit nanopartikül ve VAP yüklü katı lipit nanopartikül eklenmiş jellerin hazırlandığı bir çalışmada, Keshary Chien difüzyon hücreleri ile *in vitro* dissolüsyon çalışmaları yapılmıştır. Selüloz nitrat membran filtreleri, stratum corneum'un lipofilik özelliklerini simüle etmek için izopropil miristat ile ıslatıldı ve difüzyon hücresi üzerine monte edilmiştir. Dissolüsyon olarak %3 polisorbat 80 içeren fosfat tamponlu salin (PBS) kullanılmıştır. İlk 2 saatte, muhtemelen ilacın lipidden yavaş difüzyonu nedeniyle ilaç dissolüsyonu %10'dan az bulunmuştur. 2 saat sonra, ilaç dissolüsyon hızı

8 saat sonrasına kadar zamanla artmış ve bu oran giderek azalmıştır. Uzatılmış ilaç dissolüsyonu, ilacın katı lipid matrisine gömülmesi sebebiyle olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Farklı jel yapıcı ajanlarla hazırlanmış jellere katı lipit nanopartikül dispersiyonunun dahil edilmesi, ilaç dissolüsyonunu daha da azaltmıştır. Bu sonuç muhtemelen jelleştirici maddelerin polimerik matrisinin dissolüsyon geciktirici etkisinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Pople ve Singh, 2014).

VAP ile yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde yüzey etkin maddelerin kullanıldığı dissolüsyon çalışmalarında VAP'ın daha kolay salındığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda saf VAP, %1 Tween 80 içeren pH 6.8 PBS ortamında 3. saat sonunda %76.64 ± 2.96 dissolüsyon oranı göstermiş ve 6. Saatin sonunda %96.95 ± 2.56 göstererek neredeyse %100'e yakın bir dissolüsyon oranı göstermiştir ve literatürle uygun bulunmuştur.

VAP içeren nanopartikül formülasyonlarının dissolüsyon oranlarında 3. saat sonunda, NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlarda sırasıyla, %37.34 ± 3.32, %15.53 ± 2.17, %20.12 ± 3.65, %23.14 ± 2.75, %28.51 ± 2.63, %30.18 ± 2.87, %32.25 ± 1.20 miktarlarında dissolüsyon oranı gözlemlenmiştir (Bkz. Tablo 5.14.). Bu durum 6. saat sonunda NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlar için, sırasıyla %54.26 ± 3.45, %26.18 ± 3.23, %29.44 ± 3.35, %32.53 ± 2.93, %36.33 ± 6.34, %44.54 ± 3.63 ve %50.45 ± 4.10 olarak gözlemlenmiştir. Saf VAP ile karşılaştırıldığında tüm formülasyonların uzatılmış dissolüsyon yaptığı oldukça açıktır (Bkz. Şekil 5.7-Şekil 5.9).

Şekil 5.7., Şekil 5.8. ve Şekil 5.9.'a bakıldığında ve özellikle Şekil 5.9. incelendiğinde 1 ile 6. Saatler arasında hızlı bir dissolüsyon elde edilmiştir. Bu durum VAP'ın nanopartikül formülasyonların yüzeyine yakın bulundukları yerlerden daha hızlı salındığı şeklimde yorumlanabilir (Li vd., 2016).

Formülasyonların topikal olarak kullanımı amaçlandığından ilk 24 saatlik dissolüsyon oldukça önemlidir. 24. saat sonunda, NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonlarda sırasıyla, %84.13 ± 2.64, %57.93 ± 4.43, %65.17 ± 2.65, 69.18 ± 3.76, %71.74 ± 2.87, %74.76 ± 2.46, %80.35 ± 5.74 miktarlarında dissolüsyon oranı gözlemlenmiştir (Bkz. Tablo 5.14.). Bu sonuçlar doğrultusunda hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının topikal kullanıma uygun olduğu söylenebilir.

Tablo 5.14. ve Şekil 5.7-Şekil 5.9. incelendiğinde neredeyse tüm zaman aralıklarında hazırlanan nanopartikül formülasyonlarından VAP dissolüsyon oranının

NP-1 > NP-7 > NP-6 > NP-5 > NP-4 > NP-3 > NP-2 şeklinde olduğu gözlemlenmiştir. NP-1'in yüzeyinin kitosan ile kaplanmaması sonucunda daha hızlı dissolüsyon elde edilmiştir. Formülasyon içerikleri incelendiğinde NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların modifikasyonu için sırasıyla %0.2, %0.2, %0.1, %0.05, %0.025 ve %0.0125 konsantrasyonlarında kitosan çözeltisi kullanılmıştır. Kitosan modifiye formülasyonlar incelendiğinde ise kaplama çözeltisinin artan konsantrasyonları ile ters orantılı olarak dissolüsyon oranı azalmıştır ve bu durum literatür ile uygun bulunmuştur (Öztürk vd., 2019).

6.4.5. Dissolüsyon kinetiği

Dissolüsyon oranları ve kümülatif salım profilleri elde edildikten sonra, dissolüsyon kinetiğini belirlenmesi açısından en önemli ve popüler dört kriteri belirlemek için veriler DDSolver programına aktarılmıştır. Bu dört kriter Akaike bilgi kriteri (AIC), korelasyon katsayısı (r^2), düzeltilmiş korelasyon katsayısı ($r^2_{adjusted}$) ve Model seçme kriteri (MSC) kriter olarak belirlenmiştir. Değerlendirmede en yüksek r^2, $r^2_{adjusted}$, MSC değeri ile en düşük AIC değeri baz alınmıştır. Programda Sıfırıncı Derece Kinetik, Birinci Derece Kinetik, Higuchi Modeli, Korsmeyer-Peppas Modeli, Hixson-Crowell Modeli, Hopfenberg Modeli ve Weibull Modeli incelenmiştir (Zhang vd., 2010).

Sıfırıncı Derece Kinetik (Bkz. Tablo 5.16.), Birinci Derece Kinetik (Bkz. Tablo 5.17.), Higuchi Modeli (Bkz. Tablo 5.18.), Korsmeyer-Peppas Modeli (Bkz. Tablo 5.19.), Hixson-Crowell Modeli (Bkz. Tablo 5.20.), Hopfenberg Modeli (Bkz. Tablo 5.21.) ve Weibull Modeli (Bkz. Tablo 5.22.) r^2 değerleri incelendiğinde Weibull Modeli için elde edilen r^2 değerinin en yüksek olduğu belirlenmiştir. NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların Weibull Modeli için r^2 değerleri sırasıyla 0.982, 0.972, 0.981, 0.980, 0.979,0.986 ve 0.973 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre r^2 değerleri baz alındığında hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının Weibull Modele uyum sağladığı söylenebilir.

Tüm formülasyonlar ve modeller incelendiğinde r^2 değerlerinde olduğu gibi $r^2_{adjusted}$ değerleri Weibull Modeli için yüksek bulunmuştur. NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların Weibull Modeli için $r^2_{adjusted}$ değerleri sırasıyla 0.975, 0.963, 0.975, 0.974, 0.972, 0.981 ve 0.964 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre $r^2_{adjusted}$ değerleri baz alındığında hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının Weibull Modele uyum sağladığı söylenebilir.

Tüm formülasyonlar ve modeller incelendiğinde r^2 ve $r^2_{adjusted}$ değerlerinde olduğu gibi MSC değerleri Weibull Modeli için yüksek bulunmuştur. NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların Weibull Modeli için MSC değerleri sırasıyla 2.785, 2.633, 2.979, 2.925, 2.779, 3.118 ve 2.462 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre MSC değerleri baz alındığında hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının Weibull Modele uyum sağladığı söylenebilir.

Dissolüsyon kinetiği model seçiminde en düşük AIC değerinin önemli olduğu daha önce belirtilmiştir. Tüm formülasyonlar ve modeller incelendiğinde r^2, $r^2_{adjusted}$ ve MSC değerleri Weibull Modeli için en yüksek bulunmuşken, tam tersi olarak AIC sonuçları ise en düşük olarak elde edilmiştir. NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların Weibull Modeli için AIC değerleri sırasıyla 50.648, 51.109, 48.564, 49.195, 50.079, 46.510 ve 53.170 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre AIC değerleri baz alındığında hazırlanan tüm nanopartikül formülasyonlarının Weibull Modele uyum sağladığı söylenebilir.

Tüm değerlendirme toplu olarak incelendiğinde ve en yüksek r^2, $r^2_{adjusted}$, MSC değeri ile en düşük AIC değeri baz alındığında hazırlanan tüm formülasyonların Weibull Modele uyum sağladığı görülmektedir. DDSolver programından alınan Weibull modeli dissolüsyon kinetik grafikleri NP-1 (Şekil 5.80.), NP-2 (Şekil 5.81.), NP-3 (Şekil 5.82.), NP-4 (Şekil 5.83.), NP-5 (Şekil 5.84.), NP-6 (Şekil 5.85.) ve NP-7 (Şekil 5.86.) için incelendiğinde en yüksek r^2, $r^2_{adjusted}$, MSC değeri ile en düşük AIC değerini kanıtlar nitelikte yüksek uyumluluk gözlemlenmiştir.

Weibull modeli matriks tipte hazırlanmış nano ilaç taşıyıcı sistemler için oldukça uygun bir modeldir (Dash vd., 2010; Goldsmith vd., 1978; Langenbucher, 1972). Tüm kinetik sonuçları incelendiğinde r^2, $r^2_{adjusted}$, MSC ve AIC değerleri Weibull modeli içim en yüksek bulunmuştur fakat, Korsmeyer-Peppas modeli için elde edilen değerler Weibull modeli kadar yüksek olmasada yakın olarak elde edilmiştir. Farklı bir deyişle Korsmeyer-Peppas ve Weibull modellerinde yüksek korelasyon gözlenmiştir. PLGA NP'lerinden ilaç salınımının birden fazla modele uyabileceği daha önce bildirilmiştir (Öztürk ve Kıyan, 2020; Yang vd., 2019).

Korsmeyer-Peppas ve Weibull modellerinde yüksek korelasyon gözlendiği için dissolüsyon kinetiklerini daha fazla aydınlatmak için bazı parametreler incelenmiştir. Özellikle Korsmeyer-Peppas modelinde '*n*' değeri, ilaç dissolüsyon mekanizmasını gösteren difüzyon üssüdür. Dissolüsyon mekanizmasıyla ilgili olan n değeri farklı

değerler ve aralıklarda olabilir. Bu değer ve aralıklar şu şekilde olabilir; $n < 0.5$, $n = 0.5$, $0.5 < n < 1.0$, $n = 1$ ya da $n > 1.0$. Eğer $n < 0.5$ ise ilaç taşıyıcı sistemin yarı-fickian difüzyon mekanizması ile dissolüsyon yaptığı, $n=0.5$ ise ilaç taşıyıcı sistemin fickian difüzyonu mekanizması ile dissolüsyon yaptığı, $0.5 < n < 1.0$ ise ilaç taşıyıcı sistemin anomalus (fickian olmayan) difüzyon mekanizması ile dissolüsyon yaptığı, $n=1$ ise ilaç taşıyıcı sistemin Fickian olmayan durum II mekanizması ile dissolüsyon yaptığı ve $n > 1.0$ ise ilaç taşıyıcı sistemin Fickian olmayan süper durum II mekanizması ile dissolüsyon yaptığı literatürde bildirilmiştir (Basak vd., 2006; Öztürk vd., 2020). NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların için '*n*' değeri sırasıyla 0.318, 0.471, 0.442, 0.407, 0.358, 0.335 ve 0.341 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.19.). Bu durumda bu tez çalışmasında hazırlanan tün nanopartikül formülasyonlarındna VAP dissolüsyonu yarı-fickian difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği söylenebilir.

Weibull Modeli için 'β' değeri, bir ilacın polimerik nanopartikül matrisi boyunca taşınma mekanizmasının bir parametresidir. $\beta \leq 0.75$ değerleri fickian difüzyonunu gösterirken, 0.75-1 aralığındaki 'β' değerleri fickian difüzyon ve şişme kontrollü salınımın birleşik mekanizmasını belirtir (Öztürk ve Kıyan, 2020; Sorasitthiyanukarn vd., 2018). NP-1, NP-2, NP-3, NP-4, NP-5, NP-6 ve NP-7 kodlu formülasyonların için 'β' değeri sırasıyla 0.472, 0.549, 0.535, 0.511, 0.472, 0.453 ve 0.470 olarak elde edilmiştir (Bkz. Tablo 5.19.). Literatüre göre bu tez çalışmasında hazırlanan tün nanopartikül formülasyonlarındna VAP dissolüsyonu fickian difüzyon mekanizması ile gerçekleştiği söylenebilir.

Sonuç olarak, VAP'ın nanopartiküllerden salınması ağırlıklı olarak yalnızca bir mekanizma tarafından değil, yarı-fickian (saf difüzyon fenomeni) ve fickian dissolüsyonun (ağlar arasındaki polimer zincirinin gevşemesinden dolayı) birleşik bir mekanizması şeklinde olduğu söylenebilir (Yang vd., 2019).

6.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

6.5.1 MTT yöntemiyle HaCaT hücrelerinde proliferasyonu artıran konsantrasyonların değerlendirilmesi

MTT deneyi sonuçlarına göre, 10, 100 ve 400 $\mu g.mL^{-1}$ Vitamin A konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 122.59, % 139.14 ve % 102.43 değişiklik göstermiştir. 10, 100 ve 400 $\mu g.mL^{-1}$ NP-1 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla %

84.14, % 49.19 ve % 50.06 değişiklik göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-1 Blank konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 115.37, % 76.33 ve % 54.77 değişiklik göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-2 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 129.49, % 59.73 ve % 50.81 değişiklik göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-2 Blank konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 132.96, % 124.16 ve % 110.78 artış göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-3 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 126.52, % 123.05 ve % 87.11 artış göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-3 Blank konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 97.52, % 55.64 ve % 48.08 değişiklik göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-4 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 69.89, % 68.53 ve % 43.74 değişiklik göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-4 Blank konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 103.35, % 94.42 ve % 65.30 değişiklik göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-5 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 81.18, % 62.95 ve % 57.43 artış göstermiştir. 10, 100 ve µg.mL^{-1} NP-5 Blank konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 115.59, % 101.44 ve % 79.26 artış göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-6 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 129.26, % 108.27 ve % 78.18 artış göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-6 Blank konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 86.81, % 71.10 ve % 73.62 artış göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-7 konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 138.49, % 122.30 ve % 86.33 artış göstermiştir. 10, 100 ve 400 µg.mL^{-1} NP-7 Blank konsantrasyonları, kontrol grubuna göre HaCaT hücre canlılığında 24 saatte sırasıyla % 112.47, % 79.50 ve % 72.66 artış göstermiştir.

6.6. Nanopartiküllerin Yara İyileştirici Etkilerin Belirlenmesi

Yaptığımız yara iyileştirme çalışmasında HaCat hücreleri kullanılmıştır. 5x10^4 yoğunlukta, bariyer içeren 96-kuyucuklu özel plakaya ekilmiştir. Plakalar, 24 saat hücrelerin yapışması için inkübatörde bekletilmiştir. Süre sonunda bariyerler tarak yardımıyla hücrelerden alınmış ve mevcut besiyeri, 10 ve 100 µg.mL^{-1} VAP, 10 µg.mL^{-}

[1] VAP içeren NP-3, NP-6 ve NP-7 ve çözücü kontrolünü içeren 100 µl besiyeri içerisinde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 0. saatte kontrol %100, 24 saatin sonunda %117.76 olarak belirlenmiştir. Sırasıyla 0. saatte VAP (10 µg.mL^{-1}) % 150.67, VAP (100 µg.mL^{-1}) %170.85, NP-3 (10 µg.mL^{-1}) %176.59, NP-6 (10 µg.mL^{-1}) %179.03, NP-7 (10 µg.mL^{-1}) % 206.57 değişiklik göstermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuç VAP'ın yara iyileşmede etkili olması ve olumlu sonuç göstermesidir. En etkili grup NP-7 olarak belirlenmiştir.

Yapılan bir *in vitro* çalışmada kültürlenmiş SV40 ile insan kornea epitel hücreleri (HCE-T) üzerinde çalışmamıza benzer doğrusal çizik yaraları yapılmış ve hücreler farklı konsantrasyonlarda olan retinoik asitle formüle edilmiş nanoformülasyona maruz bırakılmıştır. Çizik yarasının kapanma derecesi yara iyileşmesi belirlemiştir. 24 saat sonraki gözlemde yaralı bölgenin azaldığı görülmüştür. Maksimum etki 33 mM'lik bir konsantrasyonda ortaya çıkmıştır. Ortaya çıkan sonuç ise retinoik asitli nanoformülasyonun yara iyileşmesinde oldukça etkili olmasıdır (Hattori vd., 2012).

Yapılan diğer bir çalışmada bitki özlerinden elde edilen maddeler (polisakkarit ve prosiyanid) HaCat keratinosit hücrelerinde test edilmişdir. 9 ve 3 günlük inkübasyondan sonra hücreler toplanmış ve sodyum fosfat tamponu pH 6.8' de üç kez ultrasonik ışınlanma ile parçalandıktan sonra santrifüjlenmiştir. Sonuç olarak yara iyileşmesi ve hücre proliferasyonunda iyi bir artış görülmüştür (Houghton vd., 2005).

Benzer bir çalışmada kitosanın keratinosit ve fibroblast hücrelerinde yara iyileştirme etkisinin olup olmadığına bakılmıştır. Deneylerde HaCat ve NIH3T3 hücreleri kullanılmıştır. Kitosanın Scratch (çizme) testi analizinde HaCat hücre göçü üzerindeki etkisine bakılmıştır ve çalışmanın sonunda düşük moleküler ağırlıklı kitosanın yara iyileştirme ve *in vitro* proliferasyonda etkili olduğu bulunmuştur (Merve, 2019).

7. SONUÇ

Yeni bir ilaç etkin maddesinin geliştirilmesi sadece zaman alıcı ve pahalı değildir, aynı zamanda genellikle başarısız olan bir işlemdir. Bununla birlikte, klinikte kullanılan ilaçların biyoyararlanımını, etkinliğini, güvenliğini artırmak veya nanopartiküller gibi çeşitli yöntemlerle hedeflemek, klinikte kullanmanın daha etkili bir yolu olabilir. Ek olarak, nanopartikül formülasyonları modern tıbbi tedavilerde giderek daha popüler hale gelmektedir. Bu tez çalışmasında Vitamin A palmitat yüklü PLGA ve kitosan kaplı PLGA nanopartikülleri hazırlanmış ve karakterize edilmiştir. Vitamin A palmitat yüklü nanopartiküllerin parçacık boyutu 196.33 ± 0.65 ile 669.23 ± 5.49 nm arasında elde edilmiştir. Kitosan çözeltisinin kullanıldığı formülasyonlarda kitosan konsantrasyonun azalması ile parçacık boyutu değeri düştüğü belirlenmiştir. Parçacık boyutu dağılımı (PDI) verileri ise tüm nanopartiküllerin kaliteli ve monodispers olarak hazırlandığını kanıtlamıştır. Blank-NP-1 ve NP-1 kodlu PLGA nanopartikül formülasyonlarının zeta potansiyel değerli negatif olarak elde edilmişken, diğer nanopartiküllerde pozitif zeta potansiyel elde edilmiştir. Elde edilen bu pozitif zeta potansiyel sonuçları, kitosanda

bulunan amino gruplarının bir sonucudur ve PLGA nanopartiküllerinin kitosan tarafından yeterince kaplandığını göstermiştir. Vitamin A palmitat'ın su fazına düşük ilgisi ve dolayısıyla organik faza göç etme eğiliminde olan lipofilik yapısından dolayı yüksek enkapsülasyon etkinliği elde edilmiş ve kapsülleme verimliliği %74.69-85.18 aralığında elde edilmiştir. Nanopartküllerin *in vitro* dissolüsyon çalışmaları, ilk 1 ile 6. saatler arasında hızlı dissolüsyon gözlenmiş fakat hızlı dissolüsyon sonrası Vitamin A palmitat dissolüsyonu uzatılmış bir şekilde olmuştur. DDSolver ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda dissolüsyon kinetiklerini ağırlıklı olarak yalnızca tek bir mekanizma tarafından değil, Fickian ve Fickian olmayan birleşik bir mekanizma tarafından yönetildiği sonucuna ulaşılmıştır. Hücre kültürü çalışması ve yara iyileştirici etkinlik çalışmaları sonucunda NP-7'nin en etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun sebebinin NP-7 kodlu formülaasyonun en düşük parçacık boyutuna sahip kitosan kaplı PLGA nanopartikülü olmasından kaynaklandığı düşünülmüş ve nanopartikül yapısı ile Vitamin A palmitat'ın etkinliğinin arttırıldığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, Vitamin A palmitat yüklü nanopartikül yapısı ile düşük doz yüksek yara iyileştirme aktivitesi bulunmuştur. Hazırlanan nanopartiküller ile kozmetik ve topikal kullanım amaçlandığından çalışmanın ileriki aşamalarında özellikle NP-7 kodlu formülasyonun yarı katı taşıyıcı bir sisteme eklenmesi, karakterizasyon ve etkinlik çalışmaları planlanmaktadır.

KAYNAKÇA

A. Alper Öztürk. (2018). *Kozmetiklere Yeni Bir Bakış: Nanokozmetikler – OTC News*.

Abouelmagd, S. A., Sun, B., Chang, A. C., Ku, Y. J., & Yeo, Y. (2015). Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: Are we doing it right? *Molecular Pharmaceutics*, *12*(3), 997–1003.

Ajazzuddin, M., … G. J.-R. P. on, & 2015, undefined. (2015). Nanocosmetics: Past, present and future trends. *Ingentaconnect.Com*, *5*, 3–11.

Akagi, T., Baba, M., Nanomedicine, M. A.-P. in, & 2011, U. (2011). Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Springer*, *247*, 31-64.

Algahtani, M. S., Ahmad, M. Z., & Ahmad, J. (2020). Nanoemulgel for Improved Topical Delivery of Retinyl Palmitate: Formulation Design and Stability Evaluation. *Nanomaterials 2020, Vol. 10, Page 848*, *10*(5), 848.

Almoustafa, H., Alshawsh, M., Of, Z. C.-I. journal, & 2017, U. (2017). Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method. *Elsevier*, *533*(1), 533(1), 275-284.

Amgoth, C., Phan, C., … M. B.-R. of N. D., & 2019, U. (2019). Polymer properties: Functionalization and surface modified nanoparticles. *Intechopen.Com*.

Araviiskaia, E., & Dréno, B. (2016). The role of topical dermocosmetics in acne vulgaris. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, *30*(6), 926–935.

Argimón, M., Romero, M., … P. M.-J. of the B., & 2017, U. (2017). Development and characterization of vitamin a-loaded solid lipid nanopartıcles for topical application. *SciELO Brasil*.

Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *17*(3), 247–289.

Babamiri, K., Journal, R. N.-A. S., 2010, U. (2010). Cosmeceuticals: the evidence behind the retinoids. *Academic.Oup.Com*, *30*(1), 74–77.

Banerjee, (2017)2017, U. (2017). Nanocosmetics: The good, the bad and the beautiful. *Academia.Edu*.

Basak, S. C., Reddy, B. M. J., & Mani, K. P. L. (2006). Formulation and release behaviour of sustained release ambroxol hydrochloride HPMC matrix tablet. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *68*(5), 594–598.

Battaglia, L., & Ugazio, E. (2019). Lipid nano-and microparticles: an overview of patent-related research. *Journal of Nanomaterials*, *2019*.

Bernauer, U., Bodin, L., Celleno, L., Chaudhry, Q., Jan Coenraads, P., Dusinska, M., Duus-Johansen, J., Ezendam, J., Gaffet, E., & Lodovico Galli, C. (2016). Scientific Committee on Consumer Safety SCCS Opinion on Vitamin A (Retinol, Retinyl Acetate, Retinyl Palmitate). *Scientific Committee on Consumer Safety SCCS Opinion On Vitamin A*.

Borman, P., & Elder, D. (2017). Q2 (R1) validation of analytical procedures. *ICH Quality Guidelines*, 127–166.

Brandt, F., Cazzaniga, A., Cutaneous, M. H.-S. in, & 2011, U. (2011). Cosmeceuticals: current trends and market analysis. *Cdn.Mdedge.Com*, 141–143.

Burnett, M. E., & Wang, S. Q. (2011). Current sunscreen controversies: A critical review. *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine*, *27*(2), 58–67.

Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., & Yazan, Y. (2016). Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. *European Journal of Pharmaceutics and*

Biopharmaceutics, *109*, 174–183.

Cañadas, C., Alvarado, H., Calpena, A. C., Silva, A. M., Souto, E. B., García, M. L., & Abrego, G. (2016). In vitro, ex vivo and in vivo characterization of PLGA nanoparticles loading pranoprofen for ocular administration. *International Journal of Pharmaceutics*, *511*(2), 719–727.

Chapman, M. S. 2012. (2012). Vitamin a: history, current uses, and controversies. *Cdn.Mdedge.Com*, *31*(1), 11–16.

Chen, H., Yang, W., Chen, H., Liu, L., Gao, F., Yang, X., Jiang, Q., Zhang, Q., & Wang, Y. (2009). Surface modification of Mitoxantrone-loaded PLGA nanospheres with chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *73*(2), 212–218.

Cohen-Sela, E., Chorny, M., … N. K.-J. of controlled, & 2009, U. (2009). A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *Elsevier*, 90–95.

Colson, Y. L., Grinstaff, M. W., Colson, Y. L., & Grinstaff, M. W. (2012). Biologically responsive polymeric nanoparticles for drug delivery. *Wiley Online Library*, *24*(28), 3878–3886.

Crucho, C., C, M. B.-M. S. and E., & 2017, U. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Elsevier*, *80*, 771–784.

Crucho, C. I., & 2015, U. (2015). Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine. *Wiley Online Library*, 24–38.

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J., … R. C.-J. of controlled, & 2012, U. (2012). PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Elsevier*, 161(2), 505-522.

Darlenski, R., Surber, C., & Fluhr, J. W. (2010). Topical retinoids in the management of photodamaged skin: From theory to evidence-based practical approach. *British Journal of Dermatology*, *163*(6), 1157–1165.

Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, *67*(3), 217–223.

Davydova, N., Stippler, E., Jin, P., & Giancaspro, G. (2010). Development and validation of a dissolution test method for vitamin A in dietary supplement tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *53*(3), 295–301.

Dreno, B., Araviiskaia, E., Berardesca, E., Bieber, T., Hawk, J., Sanchez-Viera, M., & Wolkenstein, P. (2014). The science of dermocosmetics and its role in dermatology.

Wiley Online Library, *28*(11), 1409–1417.

Durán-Lobato, M., Martín-Banderas, L., Gonçalves, L. M. D., Fernández-Arévalo, M., & Almeida, A. J. (2015). Comparative study of chitosan- and PEG-coated lipid and PLGA nanoparticles as oral delivery systems for cannabinoids. *Journal of Nanoparticle Research*, *17*(2), 1–17.

Dureja, H., Kaushik, D., Gupta, M., Pharmacology, V. K.-… of, 2005, U. (2005). Cosmeceuticals: An emerging concept. *Ijp-Online.Com*, 37(3), 155.

Ekambaram, P., & Abdul Hasan Sathali, A. (2011). Formulation and Evaluation of Solid Lipid Nanoparticles of Ramipril. *Journal of Young Pharmacists*, *3*(3), 216–220.

Emami, J., Mohiti, H., Hamishehkar, H., & 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.

Fahami, A., & Fathi, M. (2018). Development of cress seed mucilage/PVA nanofibers as a novel carrier for vitamin A delivery. *Food Hydrocolloids*, *81*, 31–38.

Farooq, U., Mahmood, T., Shahzad, Y., Yousaf, A. M., & Akhtar, N. (2018). Comparative efficacy of two anti-aging products containing retinyl palmitate in healthy human volunteers. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *17*(3), 454–460.

Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Skin anti-aging strategies.

Gaspar, L. R., Tharmann, J., Maia Campos, P. M. B. G., & Liebsch, M. (2013). Skin phototoxicity of cosmetic formulations containing photounstable and photostable UV-filters and vitamin A palmitate. *Toxicology in Vitro*, *27*(1), 418–425.

Gelperina, S., Kisich, K., … M. I.-A. journal of, & 2005, undefined. (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Atsjournals.Org*, *172*(12), 1487–1490.

Goldsmıth, J. A., Randall, N., & ROSS, S. D. (1978). On methods of expressing dissolution rate data. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *30*(1), 347–349.

Grenha, A. (2012). Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods. *Journal of Drug Targeting*, *20*(4), 291–300.

Hameed, A., Fatima, G., Malik, K., … A. M.-J. of M., & 2019, U. (2019). Scope of nanotechnology in cosmetics: dermatology and skin care products. *Jmchemsci.Com*, *2*(2), 9–16.

Hattori, M., Shimizu, K., Katsumura, K., Oku, H., Sano, Y., Matsumoto, K., Yamaguchi, Y., & Ikeda, T. (2012). Effects of all-trans retinoic acid nanoparticles on corneal epithelial wound healing. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *250*(4), 557–563.

Heng, D., Cutler, D. J., Chan, H. K., Yun, J., & Raper, J. A. (2008). What is a suitable dissolution method for drug nanoparticles? *Pharmaceutical Research*, *25*(7), 1696–1701.

Houghton, P. J., Hylands, P. J., Mensah, A. Y., Hensel, A., & Deters, A. M. (2005). In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*, *100*(1–2), 100–107.

Hubbard, B. A., Unger, J. G., & Rohrich, R. J. (2014). Reversal of skin aging with topical retinoids. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *133*(4).

Hulkower, K. I., & Herber, R. L. (2011). Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics 2011*, *3*(1), 107–124.

Jeswani, G., Paul, S., Nanocosmetics, L. C.-, & 2019, U. (2019). Safety and Toxicity Counts of Nanocosmetics. *Springer*, 299–335.

Jung, T., Breitenbach, A., & Kissel, T. (2000). Sülfobütillenmiş poli (vinil alkol)-graft-poli (laktid-ko-glikolid) s, küçük, negatif yüklü biyolojik olarak bozunabilir nanokürelerin hazırlanmasını kolaylaştırır. *Kontrollü Salım Dergisi*, *67*(2–2), 67(2-3), 157-169.

Kaul, S., Gulati, N., Verma, D., Mukherjee, S., & Nagaich, U. (2018). Role of nanotechnology in cosmeceuticals: a review of recent advances. *Downloads.Hindawi.Com*.

Kaya-Tilki, E., Dikmen, M., & Öztürk, Y. (2016). Effects of DNMT and HDAC inhibitors (RG108 and trichostatin a) on NGF-induced Neurite outgrowth and cellular migration. *International Journal of Pharmacology*, *12*(4), 351–360.

Khaledi, S., Jafari, S., Hamidi, S., … O. M.-J. of B., & 2020, undefined. (2020). Preparation and characterization of PLGA-PEG-PLGA polymeric nanoparticles for co-delivery of 5-Fluorouracil and Chrysin. *Taylor & Francis*, *31*(9), 1107–1126.

Khater, D., Nsairat, H., Odeh, F., Saleh, M., Jaber, A., Alshaer, W., Al Bawab, A., Mubarak, M. S., & Jo, A. J. (2021). Design, Preparation, and Characterization of Effective Dermal and Transdermal Lipid Nanoparticles: A Review. *Mdpi.Com*, *8*(2).

Langenbucher, F. (1972). Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves

by the Weibull distribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *24*(12), 979–981.

Li, H., Wang, M., Williams, G. R., Wu, J., Sun, X., Lv, Y., & Zhu, L. M. (2016). Electrospun gelatin nanofibers loaded with vitamins A and E as antibacterial wound dressing materials. *RSC Advances*, *6*(55), 50267–50277.

Lima, I. A. de, Khalil, N. M., Tominaga, T. T., Lechanteur, A., Sarmento, B., & Mainardes, R. M. (2018). Mucoadhesive chitosan-coated PLGA nanoparticles for oral delivery of ferulic acid.

Lu, B., Lv, X., Polymers, Y. L.-, & 2019, U. (2019). Chitosan-modified PLGA nanoparticles for control-released drug delivery. *Mdpi.Com*, 11(2), 304.

Mahalingam, M., & Krishnamoorthy, K. (2015). Selection of a Suitable Method for the Preparation of Polymeric Nanoparticles: Multi-Criteria Decision Making Approach. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *5*(1), 57.

Makadia, H., Polymers, S. S.-, & 2011, undefined. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Mdpi.Com*, *3*, 1377–1397.

Manela-Azulay, M., Dermatology, E. B.-C. in, & 2009, U. (2009). Cosmeceuticals vitamins. *Elsevier*, 469-474.

Martín-Banderas, L., Alvarez-Fuentes, J., Durán-Lobato, M., Prados, J., Melguizo, C., Fernández-Arévalo, M., & Holgado, M. Á. (2012). Cannabinoid derivate-loaded PLGA nanocarriers for oral administration: formulation, characterization, and cytotoxicity studies. *International Journal of Nanomedicine*, *7*, 5793.

Maruthi, G., Smith, A. A., & Manavalan, R. (2011). *41. Maruthi, G., Smith, A. A., & Manavalan, R. (2011)*

Mendez, A. S. L., Steppe, M., & Schapoval, E. E. S. (2003). Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *33*(5), 947–954.

Merve, H. (2019). *Kitozanın Keratinositler Üzerine Etkisinin 3-Boyutlu Deri Hücre Kültürü Modelinde Araştırılması*.

Moritz, M., Med, M. G.-M.-A. C. E., & 2015, U. (2015). Recent developments in the application of polymeric nanoparticles as drug carriers. *Dbc.Wroc.Pl*, 24(5), 749-758.

Mudshinge, S., Deore, A., Journal, S. P.-… pharmaceutical, & 2011, U. (2011).

Nanoparticles: emerging carriers for drug delivery. *Elsevier*, 129–141.

Müller, R. H., Mäder, K., & 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.

Murakami, H., Kobayashi, M., … H. T.-I. journal of, & 1999, U. (1999). Preparation of poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Elsevier*, *187*(2), 187(2), 143-152.

Nagarwal, R., Kant, S., Singh, P., … P. M.-J. of C., & 2009, U. (2009). Polymeric nanoparticulate system: a potential approach for ocular drug delivery. *Elsevier*, *136*(1), 136(1), 2-13.

Nagavarma, B., Yadav, H., … A. A.-A. J. P. C., & 2012, U. (2012). Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review 16-23.

Nagpal, K., Singh, S., Pharmaceutical, D. M.-C. and, & 2010, U. (2010). Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. *Jstage.Jst.Go.Jp*, *58*(11).

Nasir, A., Kausar, A., & Younus, A. (2015). A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials.

Öztürk, A. A. (2017). *Deksketoprofen Trometamol Yüklü Kontrollü Salım Gösteren Nanoboyutta Ilaç Taşıyıcı Sistem Geliştirilmesi ve in Vitro/In Vivo Değerlendirilmesi - ProQuest*.

Öztürk, A. Alper, Aygül, A., & Şenel, B. (2019). Influence of glyceryl behenate, tripalmitin and stearic acid on the properties of clarithromycin incorporated solid lipid nanoparticles (SLNs): Formulation, characterization, antibacterial activity and cytotoxicity. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *54*, 101240.

Öztürk, A. Alper, & Kıyan, H. T. (2020). Treatment of oxidative stress-induced pain and inflammation with dexketoprofen trometamol loaded different molecular weight chitosan nanoparticles: Formulation, characterization and anti-inflammatory activity by using in vivo HET-CAM assay. *Microvascular Research*, *128*, 103961.

Öztürk, A. Alper, Namlı, İ., Güleç, K., & Kıyan, H. T. (2020). Diclofenac sodium loaded PLGA nanoparticles for inflammatory diseases with high anti-inflammatory properties at low dose: Formulation, characterization and in vivo HET-CAM analysis. *Microvascular Research*, *130*, 103991.

Öztürk, A. Alper, Yenilmez, E., & Özarda, M. G. (2019). Clarithromycin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles for oral administration: Effect of

polymer molecularweight and surface modification with chitosan on formulation, nanoparticle characterization and antibacterial Effects. *Polymers*, *11*(10).

Öztürk, A.A., Yenilmez, E., & Yazan, Y. (2019). Dexketoprofen trometamol-loaded eudragit® rl 100 nanoparticle formulation, characterization and release kinetics. *Acta Pharmaceutica Sciencia*, *57*(1).

Öztürk, A Alper, Banderas, L. M., Cayero Otero, M. D., Yenilmez, E., & Yazan, Y. (2018). New Approach to Hypertension Treatment: Carvediol-Loaded PLGA Nanoparticles, Preparation, In Vitro Characterization and Gastrointestinal Stability. *Lat. Am. J. Pharm*, *37*(9), 1730–1771.

Panyam, J., Sahoo, S., Prabha, S., … T. B.-I. journal of, & 2003, U. (2003). Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Elsevier*, *262*(1–2), 1–11.

Parikh, J. K., Vallabhbhai, S., Engineer, C., Parikh, J., & Raval, A. (2011). Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system. *Researchgate.Net*, *25*(2), 79–85.

Parveen, S., & Sahoo, S. K. (2008). Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Drug Targeting*, *16*(2), 108–123.

Polcz, M. E., & Barbul, A. (2019). The Role of Vitamin A in Wound Healing. *Nutrition in Clinical Practice*, *34*(5), 695–700.

Pople, P. V., & Singh, K. K. (2014). Development and evaluation of topical formulation containing solid lipid nanoparticles of vitamin A. *AAPS PharmSciTech 2006 7:4*, *7*(4), E63–E69.

Raj, S., Jose, S., Sumod, U., … M. S. pharmacy & bioallied, & 2012, U. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Ncbi.Nlm.Nih.Gov*, 4(3): 186–193.

Rao, J., Science, K. G.-P. in polymer, & 2011, U. (2011). Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. *Elsevier*, 887-913.

Reis, C., Neufeld, R., Ribeiro, A., Nanotechnology, F. V.-:, And, B., & 2006, U. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Elsevier*, *2*(1), 8–21.

Riahi, R., Bush, A., Dermatology, P. C.-A. journal of clinical, & 2016, U. (2016). Topical retinoids: therapeutic mechanisms in the treatment of photodamaged skin. *Springer*, 17(3), 265-276.

Rivas, C. J. M. (2017). *Rivas, C. J. M., Tarhini, M., Badri, W., Miladi,... - Google Akademik*.

Salem, H. F., Kharshoum, R. M., Awad, S. M., Mostafa, M. A., & Abou-Taleb, H. A. (2021). Tailoring of retinyl palmitate-based ethosomal hydrogel as a novel nanoplatform for acne vulgaris management: Fabrication, optimization, and clinical evaluation employing a split-face comparative study. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 4251.

Shahidi, F., Foods, Y. Z.-J. of functional, & 2015, U. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Elsevier*, *18*, 757–781.

Shariatinia 2019. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan. *Elsevier, Volume 263*, 263, 131-194.

Shen, J., & Burgess, D. J. (2013). In vitro dissolution testing strategies for nanoparticulate drug delivery systems: Recent developments and challenges. *Drug Delivery and Translational Research*, *3*(5), 409–415.

Silva-Buzanello, R. da, Ferro, A., Chemistry, E. B.-F., & 2015, U. (2015). Validation of an Ultraviolet–visible (UV–Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly (l-lactic acid) nanoparticles. *Elsevier*, *172*, 99–104.

Silva, S., Ferreira, M., Oliveira, A. S., Magalhães, C., Sousa, M. E., Pinto, M., Sousa Lobo, J. M., & Almeida, I. F. (2019). Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, *41*(4), 378–386.

Soppimath, K., Aminabhavi, T., … A. K.-J. of controlled, & 2001, U. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Elsevier*, *70*(1–2), 70(1-2), 1-20.

Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, *70*(1–2), 1–20.

Sorasitthiyanukarn, F. N., Muangnoi, C., Ratnatilaka Na Bhuket, P., Rojsitthisak, P., & Rojsitthisak, P. (2018). Chitosan/alginate nanoparticles as a promising approach for oral delivery of curcumin diglutaric acid for cancer treatment. *Materials Science and Engineering: C*, *93*, 178–190.

Tantra, R., Schulze, P., & Quincey, P. (2010). Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. *Particuology*, *8*(3), 279–285.

Tarhini, M., Benlyamani, I., Hamdani, S., Agusti, G., Materials, H. F.-, & 2018, U. (2018). Protein-based nanoparticle preparation via nanoprecipitation method. *Mdpi.Com*, 11(3),394.

Thioune, O., Fessi, H., … J. D.-I. journal of, & 1997, U. (1997). Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Elsevier*, *146*(2), 146(2), 233–238.

Tsai, T., Dermatology, B. H.-M. I., & 2008, U. (2008). Cosmeceutical agents: a comprehensive review of the literature. *Triggered.Edina.Clockss.Org*.

Vaishali, K., Ashwini, C., Kshitija, D., & Digambar, N. (2013). Cosmeceuticals an emerging concept: A comprehensive Review. *Citeseer*, 308–316.

Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, *26*(5), 1025–1058.

Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences 2020, 21*(2), 487.

Wang, Y., Li, P., & Kong, L. (2013). Chitosan-modified PLGA nanoparticles with versatile surface for improved drug delivery. *AAPS PharmSciTech*, *14*(2), 585–592.

Yang, H., Li, J., Patel, S. K., Palmer, K. E., Devlin, B., & Rohan, L. C. (2019). Design of poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles for vaginal co-delivery of griffithsin and dapivirine and their synergistic effect for HIV prophylaxis. *Pharmaceutics*, *11*(4), 184.

Zasada, M., Allergology, E. B.-A. in D. and, & 2019, U. (2019). Retinoids: Active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Ncbi.Nlm.Nih.Gov*, 36(4), 392.

Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahi, T., Gu, W., Drugs, B. L.-M., & 2010, U. (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Mdpi.Com*, *8*, 8(7),.

Zhang, M. M., Liu, Y. G., Li, T. T., Xu, W. H., Zheng, B. H., Tan, X. F., Wang, H., Guo, Y. M., Guo, F. Y., & Wang, S. F. (2015). Chitosan modification of magnetic biochar produced from Eichhornia crassipes for enhanced sorption of Cr(vi) from aqueous solution. *RSC Advances*, *5*(58), 46955–46964.

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *AAPS*

Journal, *12*(3), 263–271.

Zhong, Y., Meng, F., Deng, C., Biomacromolecules, Z. Z.-, & 2014, undefined. (2014). Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *ACS Publications*, *15*(6), 1955–1969.

Zinder, R., & Vlad, L. (2019). Vitamin A and wound healing. *Wiley Online Library*, *34*(6), 839–849.

http- 1 : https://www.begonya.com/retinol-iceren-tum-kremler (Erişim tarihi : 23.02.2022).