MERIEM REZIGUE

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

↓

DOKTORA TEZİ

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ; Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2017

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

TOPİKAL PSORİAZİS TEDAVİSİ İÇİN NANO BOYUTLU İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO MODELLER İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

MERIEM REZIGUE

DANIŞMAN
PROF. DR. SEVGİ GÜNGÖR

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2017

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Teknoloji Doktora Programında Doktora öğrencisi MERIEM REZIGUE tarafından Prof. Dr. Sevgi GÜNGÖR'ün danışmanlığında hazırlanan "Topikal Psoriazis Tedavisi İçin Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro Modeller İle Değerlendirilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 17/04/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Yıldız ÖZSOY ERGİNER
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri-Danışman
Prof. Dr. Sevgi GÜNGÖR
İstanbul Üniversite
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç. Dr. Oya KERİMOĞLU
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç. Dr. M. Sedef ERDAL
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORİ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı

BEYAN

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

MERIEM REZIGUE (İmza)



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın Türkiye'de gerçekleştirilmesinde maddi ve manevi destek sağlayan **Cezayir Yüksek Öğretim ve Bilimsel Araştırma Başkanlığı ve Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar (YTB) Başkanlığı**'na teşekkürü borç bilirim.

Doktora öğrenimimin her aşamasında yüksek ilgisi ve desteğini esirgemeyen, tezimin yürütülmesi ve yönlendirilmesi için her türlü yardımı gösteren çok değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Sevgi Güngör**'e en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Yardım ve desteklerinden dolayı Eczacılık Teknolojisi Bölümü ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Ahmet Araman**'a;

Doktora öğrenimim boyunca gösterdiği samimiyet ve yardımlarından dolayı Sayın **Prof. Dr. Yıldız Özsoy-Erginer**'e;

Doktoram süresince ilgi ve desteklerinden dolayı Sayın **Doç. Dr. M. Sedef Erdal**'a;

Sitotoksiste çalışmalarının gerçekleştirilmesi için katkılarından dolayı Sayın **Prof. Dr. Gül Özhan** ve **Araş. Gör. Dr. Ezgi Öztaş**'a

TEM analizleri için olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan **Prof. Dr. Seyhun Solakoğlu**'na ve araştırmacı **Ebru Akyön**'e; ve konfokal analizi için kriyotom cihazının kullanılması için olanak sağlayan İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Emine Akalın**'a

Türkiye'de doktoram süresince manevi desteklerini esirgemeyen bütün uluslararası öğrencilere ve Türk arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olup, bugünlere gelmemde çok büyük emek gösteren **BABAMA**, **ANNEME**, **EŞİME** ve değerli **KARDEŞLERİME** sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21318

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Xİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... XVİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XXİİİ
ÖZET XXV
ABSTRACT ..... XXVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Deri Hakkında Genel Bilgiler 4
2.1.1. Derinin Yapısı ve Genel Özellikleri 4
2.1.2. Derinin Tabakaları 4
2.1.2.1. Epidermis 5
2.1.2.2. Dermis 6
2.1.2.3. Hipodermis (Deri Altı Yağ Dokusu) 6
2.1.2.4. Deri Uzantıları 7
2.1.3. Deriden Geçiş Yolları 7
2.1.3.1. Hücreler Arası Geçiş Yolu 7
2.1.3.2. Hücre İçi Geçiş Yolu 7
2.1.3.3. Yan Geçit Yolu 7
2.1.4. Topikal Uygulamanın Avantajları 8
2.1.5. Moleküllerin Deriden Geçişini Etkileyen Faktörler 8
2.1.5.1. Moleküle Ait Fizikokimyasal Özellikler 8
2.1.5.2. Deriye Ait Faktörler 9
2.1.5.3. İlaç Taşıyıcı Sistemine Ait Özellikler 9
2.2. Psoriazis Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler 10
2.2.1. Tanımı ve Klinik Özellikleri 10

2.2.2. Psoriazisin Etiyolojisi ve Patogenezi 11
2.2.3. Psoriazis Hastalığında Tedavi Yaklaşımları 13
2.2.3.1. Topikal Tedavi 14
2.2.3.2. Fototerapi 17
2.2.3.3. Sistemik Tedavide Kullanılan Etkin Maddeler 18
2.2.3.4. Biyolojik Moleküller 19
2.3. Tazaroten Hakkında Genel Bilgiler 20
2.3.1. Tazarotenin Yapısı ve Fizikokimyasal Özelikleri 20
2.3.2. Tazarotenin Farmakodinamik Özellikleri 21
2.3.2.1. Tazarotenin Etki Mekanizması 21
2.3.2.2. Tazarotenin Endikasyonları ve Tedavi Dozu 22
2.3.2.3. Tazarotenin Yan Etkileri 23
2.3.3. Tazarotenin Farmakokinetik Özellikleri 23
2.3.4. Tazaroten ile İlgili Literatürlerdeki Kayıtlı Çalışmalar 23
2.4. Takrolimus Hakkında Genel Bilgiler 24
2.4.1. Takrolimusun Yapısı ve Fizikokimyasal Özelikleri 24
2.4.2. Takrolimusun Farmakodinamik Özellikleri 26
2.4.2.1. Takrolimusun Etki Mekanizması 26
2.4.2.2. Takrolimusun Endikasyonları ve Tedavi Dozu 27
2.4.2.3. Takrolimusun Yan Etkileri 28
2.4.3. Takrolimus Farmakokinetik Özellikleri 29
2.4.4. Takrolimus ile İlgili Literatürlerdeki Kayıtlı Çalışmalar 29
2.5. Psoriazis Topikal Tedavisine Yönelik Nanotaşıyıcıların Önemi 31
2.6. Veziküller İlaç Taşıyıcı Sistemler 32
2.6.1. Veziküler Sistemlerin Hazırlama Yöntemleri 33
2.6.1.1. Klasik Lipozomların Hazırlanması 33
2.6.1.2. Deforme Olabilen Lipozomların Hazırlanması 33
2.6.2. Lipozomlar 35
2.6.3. Elastik (Ultradeforme olabilen) Veziküller 36
2.6.3.1. Transferzomlar 37
2.6.3.2. Etozomlar 39
2.6.3.3. Transetozomlar 40
2.6.4. Veziküler Sistemlerin İlaçların Deriden Geçişini Arttırma Yaklaşımları 43

3. GEREÇ VE YÖNTEM 47
3.1. GEREÇLER 47
3.1.1. Kullanılan Kiymyasal Maddeler 47
3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler 48
3.1.2.1. Kullanılan Aletler 48
3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler 49
3.1.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları 50
3.2. YÖNTEM 50
3.2.1. Tazarotenin Infrared (IR) Spektrumu 50
3.2.2. Takrolimusun Infrared (IR) Spektrumu 50
3.2.3. Tazarotenin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Miktar Tayini Analiz Yönteminin Geliştirilmesi 50
3.2.4. Tazarotenin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 51
3.2.4.1. Doğrusallık 51
3.2.4.2. Kesinlik 52
3.2.4.3. Doğruluk 52
3.2.4.4. Seçicilik 52
3.2.4.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limit 53
3.2.4.6. Örneklerin Stabilitesi 53
3.2.5. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi 53
3.2.6. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 54
3.2.6.1. Doğrusallık 54
3.2.6.2. Kesinlik 54
3.2.6.3. Doğruluk 55
3.2.6.4. Seçicilik 55
3.2.6.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limit 55
3.2.6.6. Örneklerin Stabilitesi 55
3.2.7. Takrolimusun LC-MS Analiz Yönteminin Geliştirilmesi 55
3.2.8. Transetozom Tipi Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Optimizasyon Çalışmaları 57
3.2.8.1. Tazaroten Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Optimizasyonu 59
3.2.8.2. Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Optimizasyonu 61

3.2.9. Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Tipi Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması 65
3.2.10. Tazarotenin Propilen Glikoldeki Doymuş Çözeltisi ile Tazaroten ve Takrolimusun Hidroetanolik Doymuş Çözeltilerinin Hazırlanması 66
3.2.11. Optimize Edilen Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Vezikül Boyutu ve Dağılımı ile Fiziksel Stabilite Çalışmaları ..66
3.2.11.1. Vezikül Boyutu ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi 66
3.2.11.2. Fiziksel Stabilitelerinin Değerlendirilmesi 67
3.2.12. Kontrol Olarak Hazırlanan Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Formülasyonlarının Vezikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Fiziksel Stabilitleri Değerlendirilmesi 67
3.2.13. Seçilen Transetozom Formülasyonları ile Transferzom ve Etozom Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları 67
3.2.13.1. Zeta Potansiyelin Ölçülmesi 68
3.2.13.2. Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması.....68
3.2.13.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi.....69
3.2.14. Tazaroten ve Takrolimusun *In vitro* Koşullarda Deriye Penetrasyonlarının Bantla Soyma Yöntemi ile İncelenmesi.....69
3.2.14.1. Deri Örneklerinin Hazırlanması.....70
3.2.14.2. *İn vitro* Penetrasyon Çalışması.....70
3.2.14.3. Bantla Soyma İşlemi 70
3.2.14.4. Ekstraksiyon İşlemi ve Derinin Tabakalarındaki Etkin Maddelerin Miktar Tayini 71
3.2.14.5. Kontrol Formülasyonları ile Yapılan Çalışmalar.....71
3.2.15. ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance Infrared) Spektroskopisi Analizi.72
3.2.16. Konfokal Lazer Mikroskop Analizi 73
3.2.17. *İn vitro* Sitotoksisite Çalışmaları.....74
3.2.18. İstatistiksel Analiz.....75
4. BULGULAR.....76
4.1. Tazarotenin Infrared (IR) Spektrumu 76
4.2. Takrolimusun Infrared (IR) Spektrumu 76
4.3. Tazarotenin HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu.....77
4.3.1. Doğrusallık.....77
4.3.2. Kesinlik 78

4.3.3. Doğruluk 79
4.3.4. Seçicilik.....79
4.3.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayin Limiti 79
4.3.6. Örneklerin Stabilitesi 79
4.4. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 80
4.4.1. Doğrusallık.....80
4.4.2. Kesinlik 81
4.4.3. Doğuruluk 82
4.4.4. Seçicilik.....82
4.4.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayin Limiti 83
4.4.6. Örneklerin stabilitesi 83
4.5. Takrolimusun LC-MS Analiz Yöntemin Geliştirilmesi 83
4.6. Transetozom Tipi Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 85
4.6.1. Tazaroten Yüklü Transetozom Formülasyonlarınına Ait Bulgular 86
4.6.2. Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonlarına Ait Bulgular 88
4.7. Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Tipi Veziküler Sistemlere Ait Bulgular.....92
4.8. Tazarotenin Propilen Glikoldeki Doymuş Çözeltisi ile Tazaroten ve Takrolimusun Hidroetanolik Doymuş Çözeltilerine Ait Bulgular 92
4.9. Optimize Edilen Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....93
4.9.1. Vezikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi 93
4.9.2. Fiziksel Stabilitelerinin Değerlendirilmesi 98
4.10. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Formülasyonlarının Vezikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Fiziksel Stabiliteleri Değerlendirilmesine Ait Bulgular 113
4.11. Seçilen Transetozom Formülasyonları ile Transferzom ve Etozom Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 114
4.11.1. Zeta Potansiyel Bulguları.....114
4.11.2. Enkapsülasyon Verimi Bulguları 116
4.11.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi.....118
4.12. Tazaroten ve Takrolimusun *In vitro* Koşullarda Deriye Penetrasyonlarının Bantla Soyma Yöntemi ile İncelenmesine ait Bulgular 120

4.13. ATR-FTIR Spektroskopisi 130
4.14. Konfokal Lazer Mikroskop Analizi (CLMS) Görüntüleri 146
4.15. In vitro Sitotoksisite Çalışmaları Bulguları 150
5. TARTIŞMA 154
KAYNAKLAR 183
HAM VERİLER 200
FORMLAR 201
ETİK KURUL KARARI 202
PATENT HAKKI İZNİ 203
TELİF HAKKI İZNİ 204
ÖZGEÇMİŞ 205

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Psoriazisin Tedavi Seçenekleri 14
Tablo 2-2: Psoriazis tedavisine yönelik topikal uygulanan preparatlara örnekler 17
Tablo 2-3: Klasik etozomların ve transetozomların ilk süspansiyon formlarındaki karşılaştırılması 41
Tablo 2-4: Son yıllarda yapılan transetozom çalışmaları ve kullanılan bileşenler 42
Tablo 3-1: Tazaroten yüklü transetozomların bileşenleri 57
Tablo 3-2: Takrolimus yüklü transetozomların bileşenleri 57
Tablo 3-3: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozom formülasyonları 59
Tablo 3-4: Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozom formülasyonları 60
Tablo 3-5: Kenar aktivatörü olarak Span 80 ve Span 85, penetrasyon artırıcı olarak oleik asit kullanılarak hazırlanan diğer tazaroten yüklü transetozom formülasyonları 60
Tablo 3-6: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 61
Tablo 3-7: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 61
Tablo 3-8: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 62
Tablo 3-9: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 62
Tablo 3-10: %2 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 63
Tablo 3-11: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 63
Tablo 3-12: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 63
Tablo 3-13: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 64

Tablo 3-14: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 64
Tablo 3-15: %4 fosfolipit ve ve diğer kenar aktivatörü tipi veya penetrasyon arttırıcı kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları 64
Tablo 3-16: Tazaroten ve takrolimus yüklü kontrol amaçlı hazırlanan transferzom ve etozom formülasyonları 65
Tablo 4-1: Tazarotenin HPLC yöntemine ait doğrusallık sonuçları (n=6) 77
Tablo 4-2: Tazaroten HPLC analiz yönteminin gün içi kesinlik verileri (n=3)..... 78
Tablo 4-3: Tazaroten HPLC analiz yönteminin günler arası kesinlik verileri (n=3)..... 78
Tablo 4-4: Tazarotenin HPLC yöntemi için doğruluk verileri (n=3) 79
Tablo 4-5: Tazarotenin HPLC analizlerinde örneklerin stabilite sonuçları 80
Tablo 4-6: Takrolimusun HPLC yöntemine ait doğrusallık sonuçları (n=3)..... 81
Tablo 4-7: Takrolimus HPLC analiz yönteminin gün içi için kesinlik verileri (n=3) 82
Tablo 4-8: Takrolimus HPLC analiz yönteminin günler arası için kesinlik verileri (n=3) 82
Tablo 4-9: Takrolimusun HPLC yöntemi için doğuruluk verileri (n=3) 82
Tablo 4-10: Takrolimusun HPLC analizlerindeki örneklerin stabilite sonuçları 83
Tablo 4-11: Takrolimusun LC-MS metoduna ait kalibrasyon doğrusu..... 84
Tablo 4-12: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlara ait bulgular..... 87
Tablo 4-13: Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlara ait bulgular..... 87
Tablo 4-14: Diğer sürfaktan tipi veya penetrasyon arttırıcı kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlara ait bulgular 88
Tablo 4-15: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular..... 88
Tablo 4-16: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular..... 89
Tablo 4-17: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular..... 89
Tablo 4-18: %3 fosfolipit ve kenar aktivatör olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular..... 90

Tablo 4-19: %2 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular 90
Tablo 4-20: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular 90
Tablo 4-21: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular 91
Tablo 4-22: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular 91
Tablo 4-23: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular 91
Tablo 4-24: %4 fosfolipit ve diğer kenar aktivatörü tipi veya penetrasyon arttırıcı kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular 92
Tablo 4-25: Tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarına ait bulgular 92
Tablo 4-26: Tazarotenin çözünürlük tayinine ait sonuçlar (n=3) 92
Tablo 4-27: Takrolimusun çözünürlük tayinine ait sonuçlar (n=3) 93
Tablo 4-28: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlarının vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 93
Tablo 4-29: Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlarının vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 94
Tablo 4-30: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 95
Tablo 4-31: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 95
Tablo 4-32: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 96
Tablo 4-33: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 96
Tablo 4-34: %2 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 96
Tablo 4-35: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 97

Tablo 4-36: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 97
Tablo 4-37: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 97
Tablo 4-38: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 98
Tablo 4-39: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozomların 5 ± 3°C'deki fiziksel kararlılığı 99
Tablo 4-40: Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozomların 5 ± 3°C'deki fiziksel kararlılığı 100
Tablo 4-41: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozomların 5±3°C'de 3 hafta bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)..... 101
Tablo 4-42: Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak tazaroten yüklü transetozomların 5±3°C'de 3 hafta bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)..... 102
Tablo 4-43: Seçilen tazaroten yüklü transetozom formülasyonların bileşenleri 102
Tablo 4-44: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 ºC'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 103
Tablo 4-45: %5 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5°C ± 3°C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 104
Tablo 4-46: %4 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 °C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 105
Tablo 4-47: %3 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 °C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 106
Tablo 4-48: %2 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 °C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 107

Tablo 4-49: %6 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 108
Tablo 4-50: %5 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 109
Tablo 4-51: %4 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 110
Tablo 4-52: %3 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 111
Tablo 4-53: Seçilen tacrolimus yüklü transetozom formülasyonları 113
Tablo 4-54: Tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3) 113
Tablo 4-55: Tazaroten ve takrolimus yüklü transferzomların 5°C ± 3°C'de belirtilen bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3) 114
Tablo 4-56: Seçilen tazaroten yüklü transetozom, transferzom ve etozomun formülasyonlarına ait zeta potansiyel (mV) değerleri (n=3) 115
Tablo 4-57: Seçilen takrolimus yüklü transetozom, transferzom ve etozomun formülasyonlarına ait zeta potansiyel (mV) değerleri (n=3) 116
Tablo 4-58: Tazaroten yüklü transetozom formülasyonları ile kontrol amaçlı hazırlanan transferzom ve etozom formülasyonlarının enkapsülasyon verimi bulguları (n=3) 117
Tablo 4-59: Takrolimus yüklü transetozom formülasyonları ile kontrol amaçlı hazırlanan transferzom ve etozom formülasyonlarının enkapsülasyon verimi bulguları (n=3) 117
Tablo 4-60: Tazaroten yüklü transetozom fomülasyonlarından tazarotenin deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3) 120
Tablo 4-61: Tazaroten yüklü kontrol formülasyonlarından/çözeltilerinden tazarotenin deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3) 121
Tablo 4-62: Takrolimus yüklü transetozom fomülasyonlarından takrolimusun deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3) 126

Tablo 4-63: Protopic ve takrolimus yüklü kontrol formülasyonlarından/çözeltilerinden takrolimusun deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3) 127
Tablo 4-64: Tazarotenin transetozom ve kontrol formülasyonları ve çözeltilerine ait ATR-FTIR analiz sonuçları (n=3) 130
Tablo 4-65: Takrolimusun transetozom ve kontrol formülasyonları ve çözeltilerine ait ATR-FTIR analiz sonuçları (n=3) 131
Tablo 4-66: Seçilen formülasyonlara ait IC_{50} değerleri 150
Tablo 4-67: Farklı konsantrasyonlardaki sodyum dodesil sülfata (SDS) ait IC_{50} değeri 151

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Derinin Yapısı 4
Şekil 2-2: *Stratum Corneum* bileşimi içindeki seramit yüzdesi (kuru ağırlık yüzdesi) 5
Şekil 2-3: Normal ve psoriatik derinin histolojik özellikleri 11
Şekil 2-4: Th17 hücrelerine dayalı psoriazisin patogenez modeli 13
Şekil 2-5: Tazarotenin yapısal formülü ve fizikokimyasal özellikleri 20
Şekil 2-6: Tazarotenin deri üzerindeki gen ekspresyonunun regülasyonunun şematik gösterimi 22
Şekil 2-7: Takrolimusun yapısal formülü ve özellikleri 25
Şekil 2-8: Takrolimusun etki mekanizması 27
Şekil 2-9: Topikal ilaç taşıyıcı olarak kullanılan nanotaşıyıcılar 32
Şekil 2-10: Lipozom tipleri, MLV; multilamellar vezikül, LUV; büyük unilamellar vezikül, SUV; küçük unilamellar vezikül 35
Şekil 2-11: Ultradeforme edilebilen veziküllerin şematik gösterimi, (A) Transferzom (B) etozom (C) transetozom 37
Şekil 2-12: Lipozomların deri üzerindeki etki mekanizmaları 43
Şekil 2-13: Ultradeforme edilebilen veziküllerin deriye penetrasyon ve permeasyonuna ait şematik gösterim 44
Şekil 2-14: Transferatomların (ultra deforme olabilen vezikül) deriden geçiş mekanizmaları 45
Şekil 2-15: Etozomal sistemlerinin deriden geçişinde önerilen model 46
Şekil 3-1: Transetozomların hazılanmasına ait şematik gösterim 58
Şekil 4-1: Tazarotenin IR spektrumu 76
Şekil 4-2: Takrolimusun IR spektrumu 76
Şekil 4-3: Tazarotene ait HPLC Kromatogramı 77
Şekil 4-4: Tazarotenin HPLC yöntemine ait kalibrasyon doğrusu 78
Şekil 4-5: Takrolimuse ait HPLC Kromatogramı 80
Şekil 4-6: Takrolimusun HPLC yöntemine ait kalibrasyon doğrusu 81
Şekil 4-7: Takrolimus LC-MS analiz yöntemine ait bir kromatogram (1000 ng/ml) 84
Şekil 4-8: Takrolimusun LC-MS metoduna ait kalibrasyon eğrisi 84
Şekil 4-9: Transetozomların hazırlanması aşamasında oluşan ince film tabakası 85

Şekil 4-10: Sonikasyon işlemi öncesi (sol tüp) ve sonrası (sağ tüp) transetozomların fiziksel görünümleri 85
Şekil 4-11: Tazaroten yüklü transetozom (TZ 4-TW 1) (sağdaki şişe) ve takrolimus yüklü transetozomun (TC 4-SK 1) (soldaki şişe) fiziksel görünümü 86
Şekil 4-12: TZ 4-TW 1 kodlu tazaroten yüklü transetozomun vezikül boyutu ve polidispersite indeksi 94
Şekil 4-13: TC 4-SK 1 kodlu takrolimus yüklü transetozomun vezikül boyutu ve polidispersite indeksi 98
Şekil 4-14: TZ 4-TW 1 kodlu transetozoma ait TEM görüntüleri (Farklı büyütmeler ile alınan görüntüler) 118
Şekil 4-15: TC 4-SK 1 kodlu transetozoma ait TEM görüntüleri (Farklı büyütmeler ile alınan görüntüler) 119
Şekil 4-16: Tazaroten yüklü transetozomları ile PG çözeltisinden tazarotenin alt ve üst *stratum corneum* ile canlı epidermis/dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik 122
Şekil 4-17: Tazaroten yüklü transetozomları ile PG çözeltisinden tazarotenin SC'daki (alt+üst *stratum corneum* toplam) ile canlı epidermis/dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik 122
Şekil 4-18: Tazaroten yüklü transetozomlar ile PG çözeltisinden tazarotenin SC'daki (alt+üst *stratum corneum toplam*) birikiminin karşılaştırılması 123
Şekil 4-19: Tazaroten yüklü transetozomları ile PG çözeltisinden tazarotenin canlı epidermis/ dermisteki birikiminin karşılaştırılması 123
Şekil 4-20: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer veziküler taşıyıcılar ile çözeltilerden tazarotenin in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı grafik 124
Şekil 4-21: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer veziküler taşıyıcılar ile çözeltilerden tazarotenin SC'daki (alt+üst *stratum corneum* toplam) ile canlı epidermis/dermisdeki birikiminina ait karşılaştırmalı grafik 124
Şekil 4-22: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer tüm transetozom formülasyonları, transferzom ve etozom ile çözeltilerden tazarotenin SC'daki (alt+üst

stratum corneum toplam) ile canlı epidermis/dermisteki birikiminina ait özetleyen karşılaştırmalı grafik 125
Şekil 4-23: Takrolimus yüklü transetozomları ile Protopic®'ten takrolimusun SC'daki ile canlı epidermis/dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik 127
Şekil 4-24: Takrolimus yüklü transetozomları ile Protopic®'ten takrolimusun SC'daki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik..... 128
Şekil 4-25: Takrolimus yüklü transetozomları ile Protopic®'ten takrolimusun canlı epidermis/ dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik..... 128
Şekil 4-26: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak Protopic® ve diğer veziküler taşıyıcılar ile hidroetanolik çözeltisinden takrolimusun in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı grafik 129
Şekil 4-27: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak Protopic® ve diğer tüm transetozom formülasyonları, transferzom ve etozom ile hidroetanolik çözeltisinden takrolimusun in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı özetleyen grafik..... 129
Şekil 4-28: Kontrol deriye ait (formülasyon uygulaması yapılmamış olan) ATR-FTIR spektrumu..... 132
Şekil 4-29: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 132
Şekil 4-30: Tazaroten yüklü TZ 3-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 133
Şekil 4-31: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1-20 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 133
Şekil 4-32: Tazaroten yüklü TZ 5-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 134
Şekil 4-33: Tazaroten yüklü TZ 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 134
Şekil 4-34: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 0,5 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 135
Şekil 4-35: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1,33 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 135

Şekil 4-36: Tazaroten yüklü TZ 6-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 136
Şekil 4-37: Tazaroten yüklü TZ TR kodlu transeferzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 136
Şekil 4-38: Tazaroten yüklü TZ ET kodlu etozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 137
Şekil 4-39: Tazarotenin PG doymuş çözeltinin uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 137
Şekil 4-40: Tazarotenin hidroetanolik doymuş çözeltinin uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 138
Şekil 4-41: Takrolimus yüklü TC 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 138
Şekil 4-42: Takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 139
Şekil 4-43: Takrolimus yüklü TC 3-SK 0,529 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 139
Şekil 4-44: Takrolimus yüklü TC 4-SK 1,33 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 140
Şekil 4-45: Takrolimus yüklü TC 3-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 140
Şekil 4-46: Takrolimus yüklü TC 4-SK 0,705 kodlu transetzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 141
Şekil 4-47: Takrolimus yüklü TC 5-SK 1,25 kodlu transeferzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 141
Şekil 4-48: Takrolimusun konvansiyonel (Protopic®) formülasyonun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 142
Şekil 4-49: Takrolimus yüklü TC TR kodlu transferzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 142
Şekil 4-50: Takrolimus yüklü TC ET kodlu etozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 143
Şekil 4-51: Takrolimusun içeren hidroetanolik doymuş çözeltisinin uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu 143

Şekil 4-52: Tazaroten yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait asimetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği 144
Şekil 4-53: Tazaroten yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait simetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği 144
Şekil 4-54: Takrolimus yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait asimetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği 145
Şekil 4-55: Takrolimus yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait simetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği 145
Şekil 4-56: Kontrol olarak Nil Kırmızısının PBS (pH 7,4) çözeltisinin deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri..... 146
Şekil 4-57: TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri 147
Şekil 4-58: TC 4-SK 1 kodlu formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri 148
Şekil 4-59: Formülasyonlar ve kontrol arasında dikey kesite ait kıyaslama (kontrol çözeltisi (a), TZ 4-TW 1 (b) ve TC 4-SK 1 (c) kodlu transetozom deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri 148
Şekil 4-60: Kontrol olarak Nil Kırmızısı PBS 7,4 çözeltisinin deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık yatay kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri 149
Şekil 4-61: TZ 4-TW 1 formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık yatay kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri 149
Şekil 4-62: TC 4-SK 1 formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık yatay kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri 149
Şekil 4-63: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi 151
Şekil 4-64: TZ 4-TW 1 kodlu tazaroten içermeyen formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi 152
Şekil 4-65: Takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi 152
Şekil 4-66: TC 4-SK 1 kodlu takrolimus içermeyen formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi 153
Şekil 4-67: Seçilen formülasyonların SDS'e göre karşılaştırmalı IC_{50} değeri 153

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ATR-FTIR: Hafifletilmiş Toplam Yansıtma-Fourier Dönüşümlü Infrared (*Attenued Total Reflectance-Fourier Transformer Infrared*)

(a:a) : Ağırlık: Ağırlık oranı

a/h: Ağırlık/Hacim

AUC: Eğri altında kalan alan

CLSM: Konfokal Lazer Mikroskobun Analizi

DMSO: Dimetil sülfoksit

DLS: Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)

HLB: Hidrofilik Lipofilik Denge

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

h/h: Hacim/Hacim

IFN: İnterferon

IL: İnterleukin

IR: Infrared Spektrumu

LC-MS: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi

Log P: Partisyon katsayısı

MTL: Miktar Tayin Limiti (LOD)

mDC: Miyeloid Dendritik Hücre

NF-AT: Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (*nuclear factor of activated T cells*)

NLC: Lipit Nano-Taşıyıcılar

NMF: Doğal Nemlendirme Faktörü

PASI: Psoriazis Alan Şiddet İndeksi (*Psoriasis Area Severity Index*)

PBS: Fosfat Tamponu

PDC: Plazmasitoid Dendritik Hücreleri

PDI: Poli Dispersite İndeksi

PUVA: Psoralen + Ultraviyole UVA

r^2: Determinasyon Katsayısı

RARs: Retinoik Asit Reseptörleri

rpm: Dakikadaki Dönüş Sayısı

RSD: Bağıl Standart Sapma

SC: *Stratum corneum*

SD: Standart Sapma

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

SLN: Katı Lipit Nanopartikül (*Solid Lipid Nanoparticle*)

TEM: Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu

Th: T yardımcı

TIG: Tazaroten ile Endüklenen Gen (*Tazarotene-Induced Gene*)

TNF: Tümör Nekroz faktörü

TL: Teşhis Limiti (LOQ)

TLR: Toll-benzeri reseptör

UV: Ultraviyole

QbD: Tasarımla kalite

ÖZET

REZIGUE, M. (2017). Topikal Psoriazis Tedavisi için Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Geliştirilmesi ve İn Vitro Modeller ile Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Psoriazis; genetik, çevresel, immünolojik faktörlere bağlı gelişen ve deride keratinositlerin çoğalmasına yol açan, enflamasyonlu kronik bir hastalıktır. Topikal tedavi, ilk seçenek olarak genellikle hastalığın lokalize formunun tedavisinde tercih edilmekle birlikte, konvansiyonel dozaj formlarının yetersiz kalabilmesi yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Son yıllarda, topikal tedavide etkin maddelerin, özellikle aşırı lipofilik moleküllerin, derinin daha derin tabakalarına taşınmasını sağlamak üzere bileşimlerinde yüksek oranda etanol ve kenar aktivatörü içeren transetozom olarak isimlendirilen nano boyutlu veziküller geliştirilmiştir.

Tez çalışmasında; antipsoriatik etkin maddelerden tazaroten ve takrolimusun transetozomların geliştirilmesine yönelik; farklı tip kenar aktivatörleri ve farklı oranlarda fosfolipit kullanılarak formülasyon optimizasyon çalışmaları yürütüldü. Elde edilen verilere dayanarak seçilen transetozom formülasyonları; vezikül boyutu, polidispersite indeksi ve fiziksel kararlılığı, zeta potansiyel değeri, enkapsülasyon etkinliği ile morfolojik özellikleri açısından karakterize edildi. Seçilen transetozom formülasyonlarından tazaroten ve takrolimusun deriye penetrasyonu bantla soyma tekniği kullanılarak kontrol formülasyonları ile karşılaştırmalı olarak kantitatif değerlendirildi. Transetozomların bileşenlerinin deri üzerindeki etkileri, stratum corneum tabakasındaki yapısal değişiklikler olarak ATR-FTIR spektroskopisi ile incelendi. Lipofilik özellikteki model bir fluoresan madde ile yüklenen transetozom formülasyonlarından fluoresan boyanın derinin hedef tabakalarındaki lokalizasyonu konfokal mikroskop analizleri ile görüntülendi. Ayrıca, optimum transetozom formülasyonlarının sitotoksitesi hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirildi.

Sonuç olarak; transetozom formülasyonlarının tazaroten ve takrolimusun in vitro koşullarda derinin canlı epidermis ve dermis tabakalarına ulaşmasını sağladığı ve hedef tabakalarındaki lokalizasyonunu arttırdığı bantla soyma tekniği ile kantitatif olarak saptanmış ve konfokal mikroskop analizleri ile görüntülenmiştir. Böylece, topikal psoriazis tedavisine yönelik tazaroten ve takrolimusun nano boyutlu transetozom tipi veziküler ilaç taşıyıcı sisteminin konvansiyonel formülasyonlara alternatif teşkil etme potansiyelinin bulunduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: tazaroten, takrolimus, transetozom, psoriazis, deriye penetrasyon.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: **21318**

ABSTRACT

REZIGUE, M. (2017). Development and Evaluation of Nanosized Drug Delivery Systems for Topical Psoriasis Treatment with In Vitro Models. Istanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Technology. Doktora Thesis. Istanbul.

Psoriasis is an inflammatory, chronic skin disease characterized by hiperproliferation of keratinocytes induced by genetic, environmental and immunological factors. Although topical therapy is the first option in treatment of its localized form, the development of new drug delivery systems is required due to insufficiency of conventional dosage forms.

In the recent years, transethosomes nanosized vesicles consisting of edge activator and high percentage of ethanol have been developed to deliver highly lipophilic drugs into deeper skin layers.

In this thesis, optimization studies of tazarotene and tacrolimus loaded transethosomes prepared using different surfactant type and lipid ratios were carried out. Then, transethosomes were characterized in terms of their particle size, polydispersity index, physical stability, zeta potential, encapsulation efficiency and morphological features. The skin penetration of selected tazarotene and tacrolimus loaded transethosomes was performed quantitatively by tape stripping method in comparison with controls. The effects of transethosomes on skin presented by the structural changes in *stratum corneum* were investigated by ATR-FTIR spectroscopy. Transethosomes were loaded with a lipophilic fluorescent compound to visualize its localisation in target sites of skin using confocal microscopy. Furthermore, cytotoxicity of the optimal transethosomes was assessed by cell culture studies.

Consequently, it was determined that transethosomes delivered tazarotene and tacrolimus into viable epidermis and dermis and improved their localisation in target sites of skin by stripping technique and confocal microscopy analysis. Thus, it was shown that tazarotene and tacrolimus loaded transethosomes as nanosized delivery system could be an alternative to their conventional formulations for topical treatment of psoriasis.

Key Words: tazarotene, tacrolimus, transethosome, psoriasis, skin penetration

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. **21318**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Psoriazis ilk defa 1841'de Ferdinand von Hebra tarafından tanımlanan kronik enflamansyonlu bir deri hastalığıdır (Schön ve Boehncke 2005). Psoriazisin kesin sebebi bilinmemekle birlikte, genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin birlikte eşlik etmesi ile derideki keratinositlerin çoğalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Jean ve Pouliot 2010; Basko-plluska ve Petronic-rosic 2012). Topikal tedavi, ilk seçenek olarak genellikle hastalığın lokalize formunun tedavisinde tercih edilmektedir (Mendonça ve Burden 2003; Mitra ve Wu 2010; Samarsekera ve ark 2012; Berth-jones 2013).

Tazaroten, psoriazis tedavisinde kullanılan sentetik özel bir retinoik asit reseptörü bir etkin maddedir (Chandraratna 1997; Dando ve Wellington 2005; Van de Kerkhof 2006). Tazarotenin etki mekanizması, keratinositlerin anormal farklılaşmasını düzelterek çoğalmasını azaltması ve enflamatuvar belirteçlerin ekspresyonunu azaltması olarak düşünülmektedir (Duvic ve ark. 1997; Yu ve ark. 2015). Tazarotenin dünya pazarında %0,05 ve %0,1'lik topikal krem, jel ve köpük tipi preparatları mevcuttur (Chandraratna 1997; Tang-Liu ve ark. 1999; Martindale 2005, Van de Kekhof 2006). Ancak, tazarotenin psoriazis tedavisi için onaylanmış topikal bir preparatı Türkiye'de henüz bulunmamaktadır (Onsun 2008; Alper ve ark. 2012). Tazaroten, aşırı lipofilik karakterde bir etkin maddde (log P=5,96) olduğu için topikal formülasyonlarının geliştirilmesi açısından problemli bir molekül olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle tazarotenin yeni formülasyonlarının optimizasyonu özellikle ilacın derideki hedef bölgelere ulaşmasının sağlanması açısından önem taşımaktadır. Tazarotenin yeni topikal taşıyıcılarının geliştirilmesi kapsamında literatürde sadece mikroemülsiyonlar ile ilgili çalışma olduğu görülmüştür (Nasr ve Abdel-hamid 2016; Patel ve ark. 2016). Tazaroten yüklü veziküller sisteminin optimizasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Takrolimus FK506 olarak da bilinen önemli bir immün sistem baskılayıcı bir moleküldür. Takrolimusun topikal tedavide derideki ana hedef bölgesi dermisteki lenfositlerdir. Takrolimus, kalsinörin fosfataz enzimini inhibe ederek *IL-2* geni transkripsiyonu inhibe eder ve böylece *T*-lenfosit yanıtı engellenir (Thomson ve ark. 1995; Patel ve ark. 2012). Atopik dermatit tedavisi için takrolimusun topikal merhemi onaylanmıştır, henüz psoriazis tedavisi için sadece yüz ve *intertrijinöz* için endikasyon dışı kullanımı söz konusudur (Beck 2005; Goebel ve ark. 2011). Topikal olarak

takrolimus %0,03 ve %0,1'lik merhem preparatları ile tedavide kullanılmaktadır (Undre ve ark. 2009). Takrolimusun çok lipofilik (log P=3,96) ve yüksek molekül ağırlığında (822 g/mol) bir bileşik olması, ideal bir topikal dozaj formuna dönüştürülmesini zorlaştırmaktadır (Venkataramanan ve ark. 1995; Goebel ve ark. 2011). Bu kapsamda; takrolimusun modifiye edilmiş lipit nano-taşıyıcıları (NLC) (Pople ve Singh 2011), etozom tipi veziküler sistemi (Li ve ark. 2012), transferzom içeren jeli (Lei ve ark. 2013), mikroemülsyonu (Goebel ve ark. 2011) ile polimerik miseller taşıyıcısının (Lapteva, Mondon ve ark. 2014) geliştirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Takrolimusun transetozom formülasyonları ile ilgili bir çalışma ise literatürde bunlunmamaktadır.

Deri hastalıklarında topikal tedavisinin başarısı, etkin maddelerin derinin hedef etki bölgesine ulaşmasına ve lokalizasyonuna bağlıdır. Topikal tedavinin etkinliğini arttırmak ve konvansiyonel dozaj şekillerinde görülen kısıtlamaların aşılabilmesi için son yıllarda topikal uygulama için yeni nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi konusunada yoğun bir ilgi olduğu görülmektedir (Cosco ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2013; Rahman ve ark. 2015; Güngör ve Rezigue 2017).

Lipozomlar, farklı yapıdaki lipitlerin kullanılması ile hazırlanan, bir veya iç içe geçmiş birden fazla lipit çifte tabaka içeren, iç kompartmanında sulu faz bulunan küresel veziküllerdir (EL Maghraby ve ark. 2006; El Maghraby ve ark. 2008; Pathak ve Thassu 2009). Konvansiyonel lipozomlar deriye uygulandıklarında daha çok *stratum corneum*'un yüzeyinde ve üst kısımlarında biriktiğinden topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok fazla tercih edilmemektedir. Lipozomların bileşimleri modifiye edilerek etkin maddeleri derinin daha derin dokularına taşıyabilen veziküler sistemler olarak etozomlar ve transferzomlar tasarlanmıştır (Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Ascenso ve ark. 2015).

Etozom ve transferzomlar, konvansiyonel lipozomlar ila karşılaştırıldığında en önemli üstünlükleri derideki ilaçların lokalizasyonunu iyileştirmeleridir (Celia ve ark. 2012; Song ve ark. 2012). Ancak, özellikle çok lipofilik karakterdeki etkin maddelerin *stratum corneum* tabakasını geçerek, canlı epidermise ulaşabilmeleri ve böylelikle daha etkin bir topikal tedavi sağlanabilmesi için bileşimlerinde yüksek oranda etanol içeren transetozomlar geliştirilmiştir (Song ve ark. 2012).

Transetozomlar, transferzomlar ve etozomların özelliklerini bir arada içeren lipit yapılı veziküllerdir. Bu yeni ultra-deforme olabilen veziküller, ilk defa Song ve ark tarafından 2012'de tanımlanmıştır. Transetozomlar bir kenar aktivatörü ile birlikte yüksek oranda etanol ile karakterize edilir (Song ve ark. 2012). Transetozomlar hem transferomlarının hem de etozomların avantajlarını sağlamaktadır (Song ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Abdulbaqi ve ark. 2016).

Bu doktora tezinin amacı; topikal psoriazis tedavisine yönelik tazaroten ve takrolimusun transetozom tipi nano boyutlu veziküler ilaç taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi ve karakterizasyonlarının ardından, optimize edilen transetozomların in vitro deriye penetrasyon çalışmalarını takiben etkin maddelerin derinin hedef tabakalarındaki lokalizasyonun bant ile soyma (tape stripping) yöntemi kullanılarak kantitatif olarak incelenmesi ve formülasyonların deri üzerindeki etkilerinin ATR-FTIR spektroskopisi ile değerlendirilmesidir. Ayrıca transetozomlara yüklenen tazaroten ve takrolimus gibi çok lipofilik karakterdeki Nil Kırmısı'nın derideki lokalizasyonun konfokal mikroskop analizleri ile görüntülenmesidir. Böylece; psoriasin topikal tedavisi için tazaroten ve takrolimusun derinin hedef tabakalarındaki birikimini ve lokalizasyonunu arttıran, konvansiyonel formülasyonlara alternatif teşkil etme potansiyeli olabilecek nano boyutlu vesiküler ilaç taşıyıcı sisteminin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

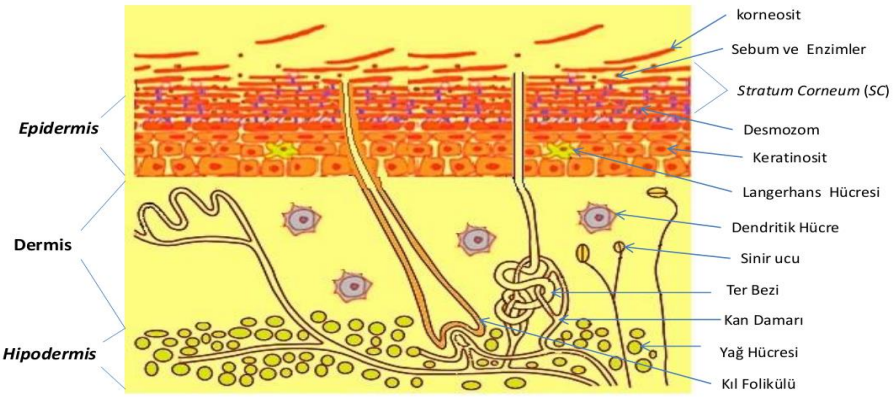
2.1. Deri Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Derinin Yapısı ve Genel Özellikleri

Deri, erişkin bir insanda 1,8 m^2 yüzey alanı ve yaklaşık olarak vücut ağırlığının %10'unu oluşturmaktadır. Doğal bir bariyer olarak insanın vücudunu kimyasal ve biyolojik etkenlerden korur. Aynı zamanda, transepidermal su kaybının önlenmesi, D vitamin metabolizması, termoregülasyonun sağlaması ve duyusal algı rolü de vardır. Deri yüzeyinin pH'si asittir ve pH değeri 4 ve 6 arasında bulunur (Yosipovich ve Maibach 1996; Walters ve Roberts 2002; Pathak ve Thassu 2009). Deri, keratinize olmuş bir çok katlı yassı epitelden ibarattır (Jean ve Pouliot 2010).

2.1.2. Derinin Tabakaları

İnsan derisi, epidermis (cansız epidermis (*stratum corneum*) ve canlı epidermis), dermis ve hipodermis (deri altı dokusu, sübkütan doku) olmak üzere 3 ana tabakadan oluşur. Bu tabakaların kalınlığı vücudun farklı bölgelerinde değişebilmektedir. Ayrıca, derinin ekleri olarak da tanımlanan başta kıl folikülleri, ter bezleri ve tırnak gibi bileşenleri de bulunmaktadır (Walters ve Roberts 2002; Pathak ve Thassu 2009; Zhang ve ark. 2013). Derinin geçirgenliği açısından, *stratum corneum* ana bariyeri oluşturur. Diğer katmanlar ve ekler de önemli işlevlere katkıda bulunur ve ilaç dağıtımında önemli hedef sitelerdir (Benson 2012). Şekil 2.1 derinin yapısını göstermektedir (Güngör ve Rezigue 2017).



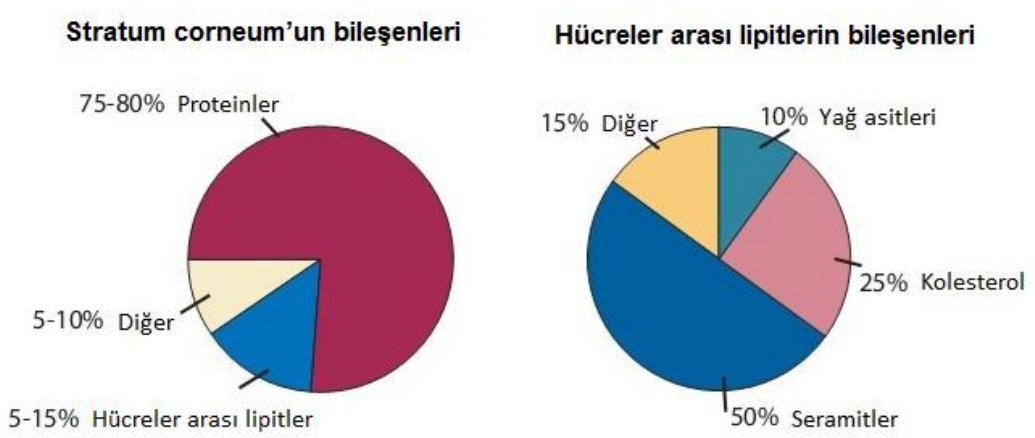
Şekil 2-1: Derinin Yapısı

2.1.2.1. Epidermis

Bazal katmanda farklılaşmaya uğrayan ve yüzeye göç eden keratinositlerden oluşan dış ortam ile temas eden katmandır. Epidermis içten dışa doğru beş tabakadan oluşmaktadır: *Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum ve Stratum corneum* (Walters ve Roberts 2002).

Histolojik açıdan epidermiste dört önemli hücre tipi bulunmaktadır: Bunlar sıra ile keratinositler, melanositler, *Langerhans* hücreleri ve *Merkel* hücreleridir. Deri, topikal olarak uygulanan bileşikleri metabolize edebilen birçok enzime de sahiptir. Bunların keratinositlerin olgunlaşması ve deskuamasyon işleminde, doğal nemlendirme faktörünün (NMF) oluşumunda ve genel homeostazda rolü vardır (Benson 2012).

Epidermisin hücrelerinin %95'i keratinositlerdir. Özellikle, 10-20 µm kalınlığında olan *stratum corneum* uzaklaştırıldıktan sonra düzenli olarak yenilenen 10 ila 15 kat korneositlerden oluşmaktadır. *Stratum corneum* korneositlerin (boynuzsu hücreler) üst üstte yığılmasından oluştuğu için boynuzsu tabaka olarak da adlandırılmaktadır (Cosco ve ark. 2008; Jean ve Pouliot 2010). Şekil 2.2 *stratum corneum*'un bileşimini göstermektedir (Dayan 2005).



Şekil 2-2: *Stratum Corneum* bileşimi içindeki seramit yüzdesi (kuru ağırlık yüzdesi)

Stratum corneum, moleküllerin deriden geçişine ve organizmadan suyun kaybına karşı etkili bir bariyer oluşturmaktadır. Derinin bariyer fonksiyonu esas olarak *stratum corneum'*un spesifik yapısı ile ilgilidir. *Stratum corneum* tabakası; aralarında harç (lipit çift katmanlar) bulunan tuğlalar (*korneositler*) ile örülü bir duvar olarak ve tuğla-harç (*brick* and *mortar*) modeli olarak tanımlanır. *Stratum corneum´*daki korneositler birbirine desmozomlar ile bağlıdır. *Stratum corneum,* seramitler, fosfolipitler, kolesterol ve kolesterol esterleri ile zengin olduğu için lipofilik özellikte bir membrandır ve etken maddelerin perkütan penetrasyonunu etkilemektedir (Walters ve Roberts 2002; Benson 2012).

Canlı epidermis ise, korneositlerin farklılaştığı farklı yapıdaki keratinosit tabakalarından oluşur (Cosco ve ark. 2008; Jean ve Pouliot 2010). Canlı epidermiste lokalize olan *Langerhans* hücreleri, derinin ana antijen sağlayan hücreleri temsil eden dendritik hücrelerdir. Bu hücreler, yüzeylerine bağlanan bir antijen tarafından aktive edildiklerinde, epidermisten dermise, daha sonra lenf nodlarına göç ederler ve orada immün yanıtı başlatmak için *T* hücrelerini aktive ederler (Benson 2012).

2.1.2.2. Dermis

Dermis tabakası, kolajen fibrillerinden oluşur ve deriye esneklik ve mekanik destek sağlar. Kalınlığı yaklaşık olarak 3-5 mm olan dermis tabakası *corium* olarak da adlandırılır. Dermis, bağ dokusu bileşenlerini (*kolajen, laminin, fibronektin, vitronektin*) üreten fibroblastlardan, enflamatuvar ve bağışıklık yanıt oluşumunda büyük rolü olan *mast* hücrelerinden ve melanin pigmentini üreten melanositlerden oluşur. Ayrıca, kan damarlar, epidermal eklentiler (uzantılar), sinirler ve sinir uçları da dermiste bulunmaktadır (Benson 2012; Gupta ve ark. 2012).

2.1.2.3. Hipodermis (Deri Altı Yağ Dokusu)

Deinin en alt tabakası olan hipodermis (deri altı doku), yağ dokusunu oluşturan adipositlerden oluşan tabakasıdır. Ayrıca, hipodermis yoluyla sinirler ve kan damarları deriye bağlanır. Hipodermis yağları; deriyi çarpmalara karşı mekanik bir yastık şeklinde koruyarak, aynı zamanda ısı bariyeri de oluşturmaktadır (Walters ve Roberts 2002; Jean ve Pouliot 2010).

2.1.2.4. Deri Uzantıları

Epidermisin dermise sarılmasıyla oluşturulan kıl follikülleri de dahil olmak üzere deriyle ilgili birçok uzantısı vardır. Bu yapılar, kıl üretmesinin yanı sıra yara iyileşmesinde ve derinin yeniden epitelizasyonda önemli rol oynayan kök hücreleri (*stem cells*) de içerir. Sebasöz bezler, kıl kökü ile ilişkili olup deriyi nemlendirmek için sebum üretir. Deri uzantıları olarak, apokrin bezler ile vücut ısısını düzenleyen ekrin ter bezleri de içerir (Benson 2012; Zhang ve ark. 2013).

2.1.3. Deriden Geçiş Yolları

Kimyasal moleküllerin deriden geçişi üç temel yolu izlemektedir:

a) hücreler arasındaki lipit tabakadan (hücreler arası yol),
b) moleküllün hücre içi keratin tabakadan (hücre içi yol),
c) deri yüzeyindeki bulunan uzantılardan (kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri gibi)

İlaçların geçişi yaklaşık olarak %99'u transepidermal yolu (interselüler ve transselüler yol kombinasyonu) izler. Bununla birlikte, ilaçların %1'i transfoliküler veya yan geçit yolu (*shunt* yol) ile derinin içerisine girer (Dayan 2005).

2.1.3.1. Hücreler Arası Geçiş Yolu

İlaç moleküllerinin deriden pasif geçişi için en önemli yol olarak tanımlanır. Polar olmayan ilaçlar hücre içi geçiş yolu ile kaşılaştırıldığında, bu yola daha iyi geçerler. Bu yol eğri-büğrü geçiş yolu olarak tanımlanır. Özellikle, Küçük ve yüksüz moleküller için idealdir (Kalia ve Guy 2001; Patzelt ve ark. 2008).

2.1.3.2. Hücre İçi Geçiş Yolu

Küçük polar moleküller bu yol ile deriden geçebilirler. Korneositler, moleküllerin bu yolla geçişini zorlaştıran yoğun çapraz bağlı proteinlerden (korneositlerdeki hücre içi keratin) oluşmaktadır (Patzelt ve ark. 2008; Benson 2012).

2.1.3.3. Yan Geçit Yolu

Kıl folikülleri, ter ve yağ bezleri büyük ve polar moleküllerin derinin daha alt tabakalarına geçmesi için alternatif bir yolak olarak kabul edilir. Kıl folikülleri deri alanın %0,1'ini kaplar, Bu geçiş yolu son yıllarda özellikle nanopartiküler sistemler için önemli olarak gösterilemktedir (Barry 2001; Lademann ve ark. 2006; Otberg ve ark. 2008).

2.1.4. Topikal Uygulamanın Avantajları

İlaçların topikal olarak uygulanması çeşitli avantjlara sahiptir (Brown ve ark. 2006; Okyar ve ark. 2012; Zhang ve ark. 2013; Schoellhammer ve ark. 2014):

- Derinin geniş yüzey alanına sahip olduğu için ilaçların permeyasyonu artar.
- Gastrointestinal yan etkiler ortadan kalkar.
- Sistemik absorpsiyon azaltılarak yan etkiler ortadan kaldırılabilir.
- Hedeflenen dokudaki etkin madde miktarı artırılarak tedavi dozu düşürülebilir.
- Acil durumlarda tedavi kesilebilir.

2.1.5. Moleküllerin Deriden Geçişini Etkileyen Faktörler

2.1.5.1. Moleküle Ait Fizikokimyasal Özellikler

***Lipofilik yapı*:** İlacın yağ/su partisyon katsayısının logaritmik dönüştürülmüş değeri (log P) ilaç moleküllerinin deriden geçişi açısından önemli bir parametredir. Genellikle deriye uygulanan ilaçların log P değerinin 1 ile 3 arasında olması bu membrandan geçişi için ideal olarak tanımlanır. Daha yüksek log P ye sahip ilaçlar (log P >3) genellikle derinin s*tratum corneum* tabakasında birikir ve daha hidrofil canlı tabakalarına epidermise partisyonunu düşük olur. Düşük log P değerine sahip olan moleküllerin ise *stratum corneum* tabakasına partisyonu zayıftır (Hadgraft ve ark. 2000; Naik ve ark. 2000; Benson 2012).

Molekül ağırlığı: Düşük molekül ağırlıklı, tercihen 500 Da'dan düşük ilaçlar deriden daha iyi geçerler (Barry 2001).

Erime sıcaklığı, suda çözünürlük ve difüzyon katsayısı: İlacın difüzyon katsayısı ve deriden geçişi arasındaki ilişki doğru orantılıdır. Etkin maddelerin düşük erime noktasına sahip olması (< 200 °C) ve sudaki çözünürlüğünün iyi olması (≥ 1 mg/ml) istenir (Naik ve ark. 2000).

Etkin maddenin iyonizasyonu: İyonize olmayan halde iken ilaçların deriden pasif difüzyonları daha yüksektir (Barry 2001).

Etkin maddenin konsantrasyonu: Formülasyondaki ilacın konsantrasyonu deriden geçişini etkiler. Genellikle ilaçlar doymuş konsantrasyonda, termodinamik aktivitesi artarak deriden geçiş hızı da artar (Naik ve ark. 2000).

2.1.5.2. Deriye Ait Faktörler

Derinin durumu: Derinin geçirgenliği, sağlıklı ve deriyi etkileyen hastalık durumlarında aynı değildir. Derinin permeabilitesi ve bariyer özelliğinin; psoriazis, enflamasyon, yara, enfeksiyon ve dermatit gibi deri hastalıklarında değiştiği saptanmıştır (Benedetto ve ark. 2012; Benson 2012).

Hidratasyon: *Stratum corneum* tabakasının hidrasyonunun arttırılması derinin geçirgenliğini arttırır. Ayrıca, suyun topikal formülasyonlarda doğal bir penetrasyon arttırıcı görevi yaptığı saptanmıştır. Endojen suyun deri yüzeyinden kaybı örtücü özellik sağlayan (oklüzif) maddeler kullanılarak önlenebilmektedir (Barry 2001; Benson 2012).

Yaş: Çocuklarda deri yaşlılara göre daha ince ve geçirgenliği daha fazladır. Yaşlılardaki derinin hem kalın hem de lipit içeriği farklı olduğu için geçirgenliği daha yavaştır (Rougier ve ark. 1988; Benson 2012).

Anatomik bölge: Derinin geçirgenliği *stratum corneum'*un farklı anatomik bölgelerindeki kalınlığı ile doğru orantılı olarak değişir ve bu durumda insan derisinin farklı bölgelerine bağlı olarak ilacın dermal absorpsiyonunu etkileyebilir. Ayrıca, ilaçların deriden emilimlerini etkileyen diğer fizyolojik faktörler arasında; sıcaklık, kanlanma hızı, derideki metabolik reaksiyonlar, farklı türler, cinsiyet ve ırk gibi etmenler de yer almaktadır (Rougier ve ark. 1988; Dayan 2005; Benson 2012).

2.1.5.3. İlaç Taşıyıcı Sistemine Ait Özellikler

İlaç taşıyıcı sistemleri etkin maddelerin formülasyondan salım hızını ve derideki birikimini etkilemektedir. Bu nedenle, etkin maddenin deriden geçişi formülasyon bileşenlerine bağlı olabilmektedir. Bu yaklaşımla, formülasyonlarda çeşitli penetrasyon maddeler kullanılmaktadır. Penetrasyon arttırıcılar özellikle *stratum corneum* üzerinde geri dönüşümlü yapısal değişikliklere neden olarak etki gösterirler. Penetrasyon artırıcılar, özellikle hücreler arası lipitlerin yapısını bozarak veya membran üzerinde bir çözücü işlevi ile deride ilacın dağılımını artırılabilmektedirler (Hadgraft 1999; Dayan 2005). Kullanılan yardımcı maddeler etkin maddelerin sıvağ veya deri tabakalarındaki partisyonunu etkileyebilmektedir. Etkin maddenin deriye partisyonu için öncellikle uygulandığı formülasyondan salımı gerçekleşmelidir. Bu durum etkin maddenin termodinamik aktivitesinin yüksek olması ile sağlanır. Ancak, etkin maddenin sıvağa ilgisinin fazla olması deriden geçiş hızını yavaşlatabilmektedir. (Williams 2003; Değim 2009 p. 345).

2.2. Psoriazis Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler

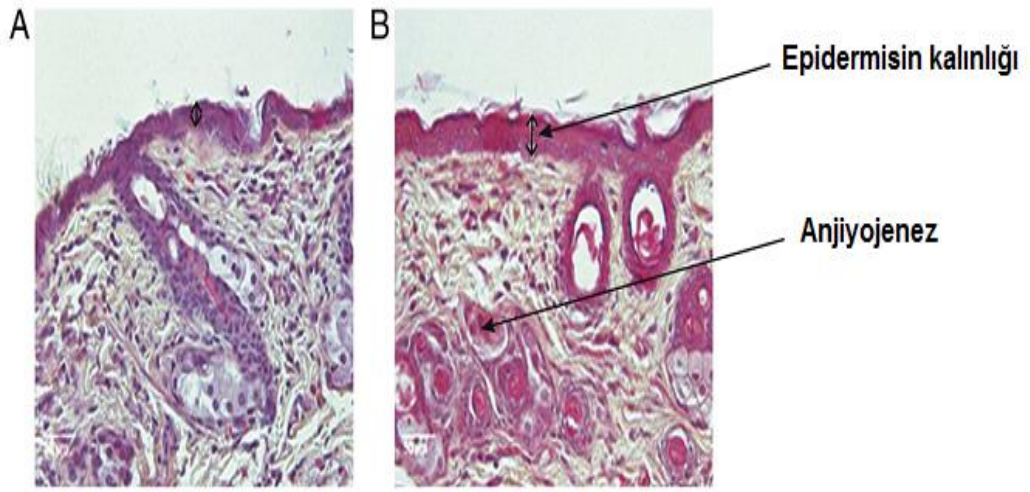
2.2.1. Tanımı ve Klinik Özellikleri

Psoriazis 1841'de Ferdinand von Hebra tarafından tanımlanan kronik bir deri hastalığıdır (Schön ve Boehnche 2005). Yunancada "*psora*" kaşıntılı ve kepekli deri hastalıklarını tanımlamak için kullanılan bir terimdir. *Skuam*ların renginden dolayı halk arasında "*Sedef Hastalığı*" olarak bilinmektedir (Gürer ve ark. 2008). Dünya çapında psoriazis eşit cinsiyet dağılımı ile genel popülasyonun %2-3'ünü etkilemektedir (Huang ve ark. 2015). Hastalık genellikle 40 yaşından önce görünür ve özellikle 20 ve 30 yaş arasındaki bir pik izlenmektedir (Basko-plluska ve Petronic-rosic 2012). Bu hastalık, hastanın yaşam kalitesini etkiler ve sosyal izolasyonuna neden olabilmektedir (Mchenna ve ark. 2003; Bhosle ve ark. 2006). Psoriazis hastalarında da kanser, miyokardiyal enfarksiyon, hipertansiyon, diyabet ve depresyon gibi diğer önemli kronik hastalıklarda görülen fiziksel ve ruhsal işlevlerinde azalma görülmektedir (Rapp ve ark. 1999).

Klinik olarak psoriazis; *Guttat, Eritrodermik, Püstüler, Ters* ve *Psoriazis vulgaris* olmak üzere beş alt tipe sınıflandırılır. Yaklaşık olarak vakaların % 90'ında görülen *psoriazis vulgaris* hastalığın en sık görülen çeşitidir (Jean ve pouliot 2010; Boehncke ve Schön 2015). Hastalığın şiddeti, hafif, orta ve ağır olarak koşullara sınıflandırılabilir (Jean ve pouliot 2010; Vincent ve ark. 2014). Şiddeti tek bir plak oluşumundan deri yüzeyinin % 90'ından fazlasını etkilemesi şeklinde değişir. Tedavi türü ve rejimi kişisel ihtiyaca göre ayarlanmalıdır (Mason ve ark. 2013).

Hastalarda metabolik sendrom, diyabet, depresyon ve kalp-damar hastalıkları da gelişebilmektedir. Tırnak tutulumu sık görülür ve psoriatik artrit psoriazis hastalarının yaklaşık %30'unda tespit edilmektedir (Samarasekera ve ark. 2012; Grozdev ve ark. 2014; Alwan ve Nestle 2015).

Kızarıklık/eritem, enflamasyon, keratinosit tabakanın hiperproliferasyonu ve değişmiş epidermal farklılaşması, psoriazis hastalığını tanımlayan dört temel deri anomalisidir (Mitra ve Wu 2010). Şekil 2.3'de normal ve psoriatik derinin histolojik özelliklerini gösterilmektedir (Pradhan ve ark. 2013).



Şekil 2-3: Normal ve psoriatik derinin histolojik özellikleri

A) Normal derinin epidermisin kalınlığı, **B)** hiperproliferatif (psöriatik) derideki epidermisin kalınlığı ve anjiyojenez (kan damarlarının oluşumu). Oklar epidermisin kalınlığını belirtir.

Simetrik düzgün kenarlı eritematöz plaklar ile yapışık gümüş skalplar hastalığın en önemli klinik belirtilerdir. Epidermisin hiperproliferasyonu ile erken keratinosit olgunlaşması ve tam olmayan kornifikasyonla beraber *stratum corneum* çekirdeğinin tutulumu skalpların oluşumuna yol açmaktadır. Epidermis ve dermiste enfamatuvar hücre infiltrasyonu ve dermis damarlarında genişleme de oluşmaktadır. Vücuttaki en çok etkilenen bölgeler (kıllı deri) kafa derisi, dirsek, diz yanısıra sırtın presakral alanıdır. Ayrıca, vücudun diğer deri bölgeleri de etkilenebilmektedir (Mitra ve Wu 2010 ; Alwan ve Nestle 2015).

2.2.2. Psoriazisin Etiyolojisi ve Patogenezi

Başlangıçta 1841 yılına kadar psoriazis cüzzamın bir çeşiti olarak kabul edilmiştir. Ancak daha sonra Von Hebra tarafından psoriazisi ayrı bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Perera ve ark. 2012). Psoriazisin kesin sebebi bilinmemektedir ve şimdiye kadar bu hastalığın oluşumu çok iyi anlaşılamamıştır. Diğer taraftan, genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin birlikte eşlik etmesiyle, derideki keratinositlerin çoğalmasına yol açtığını düşünülmektedir (Jean ve Pouliot 2010; Basko-plluska ve Petronic-rosic 2012).

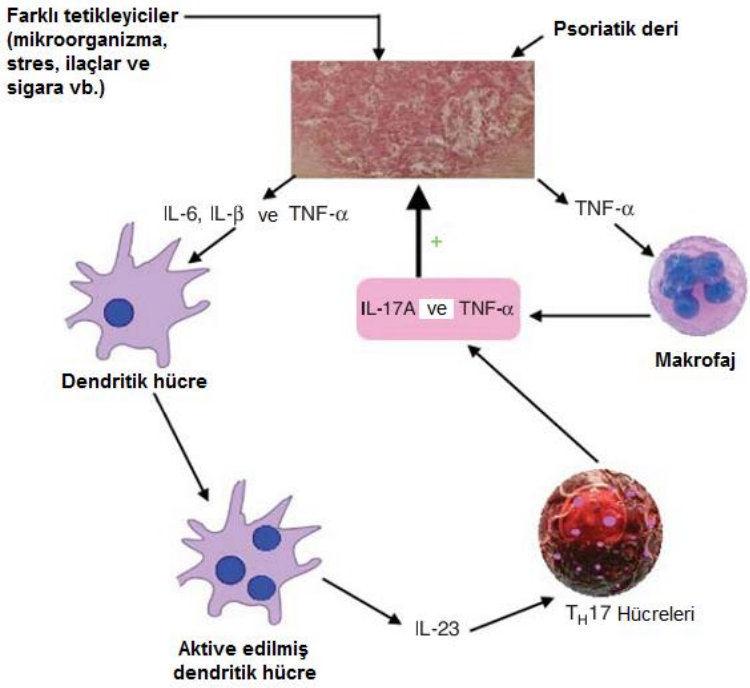
Süper antijenler tarafından *T* hücrelerine dayalı otoimmün reaksiyonun tetiklenmesi ile psoriazisin indüklenmesine neden olduğu düşünülmektedir (Boehncke ve ark. 1996). Psoriatik epidermisteki bazal keratinositlerin mitotik oranı normal deriye göre daha fazladır. Keratinositler bazal tabakadan epidermis yüzeyine doğru daha hızlı göç ederler ve böylece daha kısa bir hücre döngüsüne sahip olurlar (Duvic ve ark. 1997).

*Th1 y*olunun sitokinleri (*İnterferon IFN-gama, interlökin IL-2 ve IL-12*) psoriatik plaklarda baskın olduğu için psoriazis, *T yardımcı (Th1)* hastalığı olarak sınıflandırılmıştır (Chong ve ark. 2013). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, IL-23 / Th17 immün ekseninin psoriazis gelişiminde önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Gaffen ve ark. 2015). Travma, stres, enfeksiyonlar ve bazı ilaçlar gibi çevresel tetikleyiciler, polijenik yatkın kişilerinin derilerinde abartılmış bir enflamatuvar yanıtı başlatabilmektedir (Monteleone ve ark. 2011).

Başlangıç aşamasında, travma veya enfeksiyondan sonra keratinositlerden antimikrobiyal peptit LL37 serbestleşir. Daha sonra, bu peptit DNA'ya ve stresli veya ölü deri hücreleri tarafından üretilen küçük parçalara bağlanıp bir kompleks oluştur. Bu kompleks plazmasitoit dendritik hücreleri (PDC) aktive ederek IFN-α gibi tip I IFN ortaya serbestleşir. Ardından, IFN (tip I) ve Toll-benzeri reseptör 8 (TLR 8) yoluyla oluşan immün kompleksler miyeloit DC'leri (mDCs) aktif hale getirirler (Jiang ve ark. 2015). Aktive edilen mDC˙ler IL-23 ve IL-12 serbestleştirerek Th17, Th1 ve Th22 hücreleri aktif hale getirir ve IL-17, IL-22, IFN-γ gama ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi sitokinler bu hücreler tarafından salgılanır.

Bu sitokinler keratinositler üzerinde etki göstererek psoriatik enflamasyonu yoğunlaştırır. Bu anahtar sitokinlerin (IL-23, TNF ve IL-17) psoriazis sürecindeki önemi antisitokin antikorların üzerindeki yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Lowes ve ark. 2014; Jiang ve ark. 2015).

Şekil 2.4’de genel olarak psoriazis için Th17 hücrelerine dayalı patogenez modeli gösterilmektedir (Rahman ve ark. 2015).



Şekil 2-4: Th17 hücrelerine dayalı psoriazisin patogenez modeli

Hastalıkta rol oynanan enflamatuvar sitokinlerin psoriazis lezyonlarında oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, hastalığın ciddiyeti bu sitokinlerin serumdaki seviyesi ile de ilişkilidir. Psorizisteki deri keratinositlerinin hiperproliferasyonu, enflamasyonu ve neovaskülarizasyonu gibi klinik belirtilerin çoğunluğu psoriazis lezyonlarında bulunan sitokinlerin etkisi ile açıklanmaktadır. Ayrıca, hastalık sürecinde kritik rol oynayan sitokinler dikkate alınarak potansiyel tedavi seçenekleri de önerilebilmektedir. Psoriaziste önemli rol oynayan pek çok anahtar sitokinler başarıyla hedeflendirilmiştir. Bu durum hastalığın tedavisinde bir devrim olarak nitelendirilmiştir (Baliwag ve ark. 2015).

2.2.3. Psoriazis Hastalığında Tedavi Yaklaşımları

Psoriazis için uygun bir tedavi yaklaşımı uygulamak için, lezyonların lokalize olması (lezyonlar vücut yüzey alanının yaklaşık < %10'unu kapsar) ve yaygınlaşması durumu dikkate alınır. Topikal tedavi, birinci basamak tedavi olarak tanımlanır ve genellikle hastalığın lokalize olduğu formunun tedavisinde yeterli ve etkilidir. Bununla birlikte, hastalığın yaygınlaşması durumunda topikal tedavi yetersiz olmakta, bu durumda ikinci basamak tedavi olarak fototerapi ve sistemik tedavi kullanılmaktadır. Bu tedavi seçenekleri yetersiz ya da etkisiz olduğunda ise; biyolojik moleküllerin

uygulanması üçüncü basamak tedavi olarak uygulanmaktadır (Mendonça ve Burden 2003; Mitra ve Wu 2010; Samarasekera ve ark. 2012; Berth-jones 2013). Psoriazis tedavisinde uygulanan yaklaşımlar ve ilaç molekülleri Tablo 2.1´de verilmiştir (Güngör ve Rezigue 2017).

Tablo 2-1: Psoriazisin Tedavi Seçenekleri

Topikal ilaçlar	Kortikosteroidler: klobetazol propionat, diflorason diasetat, halobetazol propionat, betametazon dipropionat, amsinonid, mometazon furoat, fluosinolon asetonid, triamsinolon asetonid, betametazon valerat, vb D3vitamin analogları: kalsipotriol Kalsinörin inhibitörleri: takrolimus, pimekrolimus Retinoidler: tazaroten Diğerler: kömür katranı, ditranol, yumuşatıcılar
Fototerapi	Dar bant UVB Geniş bant UVB Psoralen ve UV
Sistemik ilaçlar	İmmünomodülatörler: Siklosporin Retinoidler: asitretin Diğerler: metotreksat, fumarik asit esterleri
Biyolojik ilaçlar	Etanersept, adalimumab, infliksimab, Golimumab, ustekinumab, sekükinumab

2.2.3.1. Topikal Tedavi

Topikal tedavi özellikle hafif ve orta psoriazis için etkilidir. Daha şiddetli vakalarda da ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Psoriazis hastalarının yaklaşık %70-80'i sadece topikal uygulama ile tedavi edilebilen hastalığın hafif formuna sahiptirler. Topikal tedavide, kortikosteroitler, D vitamini türevleri ya da bu ilaç moleküllerinin kombinasyonları kullanılır. Potent ve özellikle çok potent kortikosteroitler zor tedavi edilen skalp (kafa derisi) tedavisinde kulanılır. D3 vitaminin analoglarından daha etkilidir. Tazaroten gibi retinoitler, kömür katranı ve ditranol de etkili birer topikal tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Üstelik topikal kalsinörin inhibitörüleri (takrolimus ve pimekrolimus) yüz ve kıvrım bölgeleri gibi zor tedavi edilen bölgeler için kullanılır (Ashcroft ve ark. 2000; Berth-jones 2013; Boehncke ve Schön 2015).

Emolyentler de hiperproliferasyon, farklılaşma ve apoptozu normalleştirdiği için topikal tedavide ek olarak kullanılabilmektedir (Fluhr ve ark. 2008).

Topikal tedavinin etkinliği genellikle "*Psoriazis Alan Şiddet İndeksi*" (*Psoriasis Area Severity Index:* PASI) ile değerlendirilir. Bu indeks PASI 50, PASI 75 veya PASI 90 gibi, hastaların topikal tedavi uygulandıktan sonra kendi tabanları ile karşılaştırarak hastalığın şiddetinde % 50, % 75 veya % 90 azalma şeklinde yüzde değer olarak ifade edilir (Chong ve ark. 2013).

Kortikosteroitler: Topikal kortikosteroitler, antienflamatuvar, immünosüpressif ve antiproliferatif etkilerine dayalı olarak hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Psoriazisin lokalize formuna sahip hastalarda tedaviye genellikle topikal kortikosteroit uygulaması başlanır. Fakat kortikosteroitler uzun bir süre kullanıldığında, atrofi, telanjiektazi, steroid rozasea ve ağız çevresinde dermatit gibi yan etkiler gösterdiğinden bu ilaçların kullanımı sınırlanmıştır. Kortikosteroitler tek başına kullanıldığı gibi diğer moleküller ile kombine halde de uygulanır. Topikal kortikosteroitlerin azalan etki gücüne bağlı olarak İngiltere'de dört ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yedi sınıfa ayrılır. Topikal kortikosteroitler dikkatli kullanıldığında ise etkili ve güvenli bir tedavi seçeneği olarak kabul edilir (Horn ve ark. 2010; Mitra ve Wu 2010).

D3 Vitamini analogları: D3 vitamini aktif formunun kemik mineralizasyonu ve kalsiyumun barsak emilimininde önemli rolü vardır. Ayrıca, hücre farklılaşmasının stimülasyonu, proliferasyon inhibisyonu ve immünomodülasyon gibi biyolojik etkilerine dayalı olarak, D3 vitamini psoriazis tedavisinde önemli bir aday olarak kabul edilir (Mitra ve Wu 2010). Kalsipotriol, D3 vitamin analogu, genellikle merhem şeklinde topikal olarak psoriazis tedavisinde kullanılır. Kalsipotriolun farmakolojik açıdan derideki hedef bölgesi alt epidermisteki keratinositlerin üzerindeki D vitaminin reseptörüdür. Kalsipotriol keratinositlerin farklılaşmasını normalleştirir ve proliferasyonunu baskılar (Varma ve ark. 2014). Ancak, kalsipotriol kullanıldıktan sonra hastaların yaklaşık %20'sinde deri tahrişi gözlenmiştir. Kalsipotriol, topikal kortikosteroitler, fototerapi, asitretin, siklosporin, tazaroten, ve metotreksat ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Kalsipotriolün bu ilaçlar ile kombine edildiğinde uygulama dozu azaldığı için yan etkileri de en aza indirilmiştir (Lin ve ark. 2010).

Kalsinörin inhibitörleri: Topikal kalsinörin inhibitörleri, aktive edilmiş T hücrelerinin çekirdek faktörü (*nuclear factor of activated T cells,* NF-AT) transkripsiyon faktörüne bağlı olan enflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonunu baskılamaktadır. Yüzde ve kıvrımlarda görülen psoriazisin tedavisinde yaygın olarak kullanılan diğer topikal ilaçların çok önemli yan etkileri vardır. Örneğin, topikal steroitler atrofi riskinden dolayı uzun süre yüze ve kıvrımlara kullanılmaz. Bunun yanı sıra, D vitamini türevleri ve topikal retinoitlerin tahriş oluşturma potansiyelleri de topikal tedavide kullanımını sınırlandırmaktadır. Dolayısıyla, takrolimus ve pimekrulimus gibi kalsinörin inhibitörlerinin topikal uygulanması, özellikle kıvrımlarda ve yüzde görülen psoriazis tedavisi için iyi birer aday moleküller olarak gösterilmektedirler (Luger ve Paul 2007). Günümüzde hafif ve orta şiddetteki atopik dermatit tedavisinde onaylı olarak kullanılan kalsinörin inhibitörlerinin psoriazisteki kullanımı ise henüz onaylanmamıştır (Mitra ve Wu 2010).

Retinoitler: Topikal retinoitler psoriazis tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tazaroten özel bir retinoik asit reseptörüdür ve klinik çalışmalara göre psoriazisin tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Duvic ve ark. 1997).

Diğer maddeler:

Kömür katranı: Psoriazis tedavisinde yaklaşık 80 yıldır kullanılmaktadır. Genellikle, UV tedavisi ile kombinasyon halinde verilir. Özellikle skalp, palmoplantar psoriazis ve lokalize kronik plak lezyonların kontrolünde kullanılır. Kozmetik açıdan kokusu ve giysileri boyaması nedeniyle tedavide çok terch edilmez (Dvorakova ve Markham 2013).

Ditranol: Psoriazis tedavisi için çok etkili bir topikal uygulanan moleküldir. Sistemik yan etkileri olmadığı ve özellikle kortikosteroitler gibi deri atrofisine neden olmadığı için ditranol birinci basamak tedavide kullanılan bir etkin maddedir. Ditranolun etki mekanizması hala iyi açıklanamamıştır. Dithranolün DNA replikasyonu ve onarımında bir role sahip olması; hücresel solunumu inhibisyonu ile hücrenin proliferasyonu ve enflamasyonunda rol oynanan enzimleri etkilemesi; keratinositlerde, epidermal büyüme faktörün reseptörünün fosforilasyonunu indüklmesi ve derideki reaktif oksijen türlerini artırması gibi teoriler önerimiştir. Deri ve giysinin boyanması, istenmeyen pro-enflamatuar etkiler ditranol kullanımı sınırlamıştır. Ayrıca, molekül güneş ışık ve havaya duyarlıdır (Lau ve ark. 2013).

Tablo 2.2'de psoriazis tedavisine yönelik topikal ilaçlar ile formülasyonları ve dünya pazarında bulunan ürünleri verilmiştir (Mitra ve Wu 2010).

Tablo 2-2: Psoriazis tedavisine yönelik topikal uygulanan preparatlara örnekler

İlaç	Formülasyon	Hastalık tipi	Ticari ürün
Kortikisteroitler			
Klobetazol propiyonat	Merhem, sprey, köpük, losyon, şampuan	Plak ve skalp psoriazis	Temovate®merhemi, Olux®köpüğü, Clovex®spreyi
Halobetazol propiyonat	Merhem	Plak psoriazis	Ultravate®merhemi
Betametazon	Krem, jel, losyon, köpük	Plak ve skalp psoriazis	Diporsone®merhemi, Luxiq®köpüğü
VitaminD3 analogları			
Kalsipotriol	Merhem, krem, solüsyon	Plak, skalp ve tırnak psoriazis	Dovonex®merhemi
Takalsitol	Merhem	Plak psoriazis	Curatoderm®merhemi
Retinoitler			
Tazaroten	Jel, krem	Plak psoriazis	Tazorac®jeli ve kremi
Kömür katranı	Merhem, jel, solüsyon, şampuan, sabun	Plak ve skalp psoriazis	Exorex®losyonu, Alphosyl®kremi ve losyonu
Ditranol (Antralin)	Merhem, krem	Plak psoriazis	Micanol® kremi
Kalsinörin inhibitörleri			
Takrolimus	Merhem	Yüz, genital bölge ve intertrijinöz psoriazis	Protopic® merhemi
Pimekrolimus	Krem	İntertrijinöz psoriazis	Elidel® kremi
Kombinasyon ürünü			
Kalsipotriol + betametazon dipropionat	Merhem	Plak, skalp ve tırnak psoriazis	Taclonex® merhemi
Betametazon dipropionat + salisilik asit	Merhem	Plak, skalp ve tırnak psoriazis	Diprosalic® merhemi

2.2.3.2. Fototerapi

Klasik fototerapilerde yaygın olarak kullanılan dar bant UVB ve daha az uygulanan PUVA (Psoralen + ultraviyole UVA) gibi fotokemoterapi tedavisini içermektedir.

Dar bant UVB (311- 313 nm) daha az eritem oluşturma etkisi, hızlı arınma ve uzun süreli hastalığın hafiflemesini sağladığı için geniş bant UVB tedavisinin yerini almıştır. Dar bant UVB ile çocuklar ve hamileler tedavi edilebilmektedir (Dvorakova ve Markham 2013; Boehncke ve Schön 2015).

Psoralea Corylifolia tohumları psoriazis tedevisinde yaygın olarak kullanılan PUVA'daki (Psoralen + ultraviyole UVA) psoralen ile zengindir. PUVA'nın psoriazis ve diğer deri hastalıklarında etkin olduğu 1974'de gösterilmiştir. Bununla birlikte, PUVA'nın deride immün yanıtı baskılayıcı ve mutajenik etkileri de vardır. Ayrıca hayvanlarda tümörlerin gelişimine neden olduğu için insanlarda potansiyel kanserojen olduğu kabul edilmiştir (Puglia ve Bonina 2012; Stern 2012). PUVA'nın karsinojenik potansiyeli bu tedavisinin uzun süreli kullanımını kısıtlamaktadır. Fototerapi ve fotokemoterapi tedavileri, yüksek etkinlik göstermelerine rağmen zaman alıcıdır ve sadece kısa süreli olarak uygulanır (Boehncke ve Schön 2015).

2.2.3.3. Sistemik Tedavide Kullanılan Etkin Maddeler

Psoriazis hastalığının sistemik tedavisinde metotreksat, siklosporin A, retinoitler, asitretin, ve bazı ülkelerde fumarik asit esterleri kullanılmaktadır. Ancak, fumarik asit esterleri dışında diğer moleküler sistemik kullanıldığında potansiyel yan etkileri oldukça ciddidir (Gottlieb 2005; Boehncke ve Schön 2015).

Metotreksat: Metotreksat psoriazisin plak, guttat, püstüler ve eritrodermik fenotiplerinin tedavisi için sistemik olarak 40 yıldan fazla kullanılmaktadır. Folik asidin bir antagonistidir ve antineoplastik etkisi ile oral veya parenteral olarak verildiğinde, psoriazis ve romatizmal artritin tedavisinde başarı sağlamaktadır. Metotreksat dihidrofolat redüktaz enzimi inhibe ederek DNA sentezini önler, böylece mitotik aktivite engellenir. Hepatotoksisite, bulantı, kusma, anemi ve trombositopeni gibi yan etkileri ise metotreksatın uzun süreli sistemik kullanımına bağlı olarak görülen yan etkileri arasındadır (Saurat ve ark. 2008; Vemulapalli ve ark. 2008; Kalb ve ark. 2009).

Siklosporin A: Halkalı undekapeptit makrolit grubu bir moleküldür. İlk immünosüpresan olarak Sandimmune® isimli orijinal müstahzarı 1983 yılında onaylanmıştır ve daha sonra Neoral® isimli preparatı ile pazara çıkmıştır. Oral yol ile verildiğinde, dermis ve epidermisteki bulunan *T* hücrelerini hedefleyerek şiddetli ve tedaviye cevap vermeyen psoriazisin tedavisinde etkin olduğu gösterilmiştir. Siklosporin A kalsinörin fosfatazı inhibe ederek IL-2 ve başka sitokinlerin

ekspresyonunu düzenleyen aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörünün (NF-AT) translokasyonu düzenler (Rosmarin ve ark. 2010; Lapteva, Santer ve ark. 2014). Ancak, siklosporinin böbrek ve karaciğer toksisitesi sözkonusudur. Sistemik yol ile uygulandığında, immün sisteminin zayıflamasına bağlı ciddi yan etkilere yol açabilme potansiyeli de mevcuttur (Chen ve ark. 2015).

Retinoitler: Tazaroten ve asitretin gibi retinoitler psoriazis tedavisinde kullanılmaktadır. Retinoitler, nükleer retinoit reseptörlerini aktive ederek enflamasyonu baskılarlar ve bunun sonucunda epidermal proliferasyonu kontrol edebilmektedirler. Sistemik retinoitlerin kullanımındeki en büyük dezavantaj ise terapötik aktiviteleri yanında teratojenik etkilerinin de bulunmasıdır (Van De Kerkhof 2006).

Asitretin: Sentetik bir retinoittir ve etki mekanizması tam olarak henüz anlaşılamamıştır. Proliferasyon ve farklılaşmayı iyileştirdiği, antienflamatuvar ve immünomodülatör özelliklere sahip olduğu düsünülmektedir (Ortiz ve ark. 2013).

Fumarik asit esterleri: Uygun ve uzun süreli klinik etkinlikleri nedeniyle şu anda bazı ülkelerde psoriazis tedavisinde kullanılmaktadır. Düşük dozla tedaviye başlanarak ve dozun kademeli olarak artırılması ile, kızarma, gastrointestinal semptomlar ve lenfopeni gibi yan etkilerin azaltılabileceği ve hatta önlenebileceği belirtilmektedir (Dvorakova ve Markham 2013).

2.2.3.4. Biyolojik Moleküller

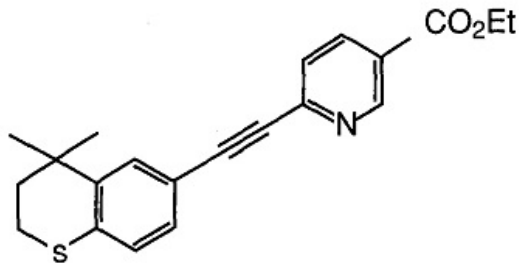
Son yıllarda, bazı biyolojik moleküllerin psoriazis tedavisinde kullanılması onaylanmıştır. Bu onaylanan biyolojik moleküller arasında füzyon proteini olan etanersept dışında monoklonal antikorlardır. Adalimumab, etanercept ve infliksimab gibi TNFα inhibitörlerin, psoriazis ve psoriatik artrit tedavisinde etkinliği gösterilmiştir. Psoriatik artrit için güçlü bir molekül olan Golimumab da onaylanmıştır. Ustekinumab çok önemli olan efektör hücreler Th17 lenfositlerin gelişmesini kısıtlamaktadır. Secukinumab, Th17 tarafından salınan anahtar efektörü IL-17A'yı bloke edebilen ilk moleküldür. Biyolojik moleküllerin şiddetli psoriazis tedavisinde konvansiyonel sistemik ilaç moleküllerinden daha üstün etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Gottlieb 2005; Saurat ve ark. 2008; Boehncke ve Schön 2015).

2.3. Tazaroten Hakkında Genel Bilgiler

Tazaroten, retinoitlerin asetilenik sınıfının bir üyesidir. Psoriazis, akne ve güneş hasarlı derinin tedavisi için onaylanmıştır. Tazaroten, üçüncü jenerasyon topikal uygulanan bir retinoit olup, pazarda krem, jel veya köpük tipi preparatları olarak bulunmaktadır. Preparatları %0,05 ve % 0,1 tazaroten içerir (Martindale 2005; Yu ve ark. 2015). Psoriazisin topikal tedavisi için onaylanmış ilk reseptör seçici bir retinoittir. Plak psoriazisin hafif ile orta şiddetli formlarında etkin bulunmuştur. Tazaroten aktif metaboliti olan tazarotenik asit metabolize olup, retinoik asit reseptörlerine bağlanmaktadır. Tazaroten antienflamatuvar etki göstermesi yanında, keratinosit farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenleyen etkilere de sahiptir. Kortikosteroitler ile karşılaştırıldığında; tedavinin kesilmesinden sonra hastalığın nüks etme oranı daha azdır (Kutulbay ve Karakuş 2012; Yu ve ark. 2015).

2.3.1. Tazarotenin Yapısı ve Fizikokimyasal Özelikleri

Tazarotenin kimyasal formülü ve fizikokimyasal özelikleri Şekil 2.5'te özetlenmiştir (Martindale 2005; Herbig ve ark. 2015; Yu ve ark. 2015).



Etil 6- [2- (4,4-dimetil-3,4-dihidro-2H-l-benzotiopiran-6-il) etinil] piridin-3-karboksilat

Kapalı Formülü: $C_{21}H_{21}NO_2S$
Molekül Ağırlığı: 351,462 g/mol
Erime Noktası: 95-98ºC
Log P: 5,6
pKa: 1,23
Suda çözünürlüğü: 0,00075 mg/ml

Şekil 2-5: Tazarotenin yapısal formülü ve fizikokimyasal özellikleri

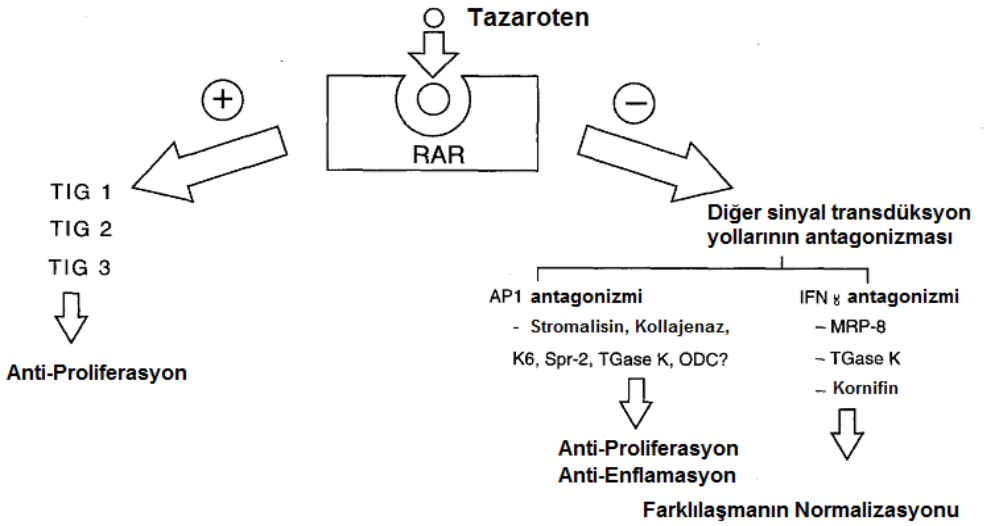
2.3.2. Tazarotenin Farmakodinamik Özellikleri

2.3.2.1. Tazarotenin Etki Mekanizması

Tazaroten sentetik asetilenik retinoit ve özel bir retinoik asit reseptörüdür. Klinik çalışma bulguları ile psoriazis tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir. Psoriazis tedavisinde topikal tazarotenin moleküler etki mekanizması ise tam olarak aydınlatılamamıştır. Tazaroten bir ön ilaçtır, topikal uygulamanın ardından tazaroten aktif metaboliti tazarotenik asiti oluşturmak için esteraz hidrolizine maruz kalır. Tazarotenin aktif formu olan tazarotenik asit retinoik asit reseptörlerine RAR için seçici bir ilgiye sahiptir ve RAR-γ ve RAR-β yoluyla transaktivasyon gösterir. RAR-α üzerinde daha az etkisi varken RXR üzerinde herhangi bir etkisi yoktur (Chandraratna 1997; Dando ve Wellington 2005; Van De Kerkhof 2006).

Tazaroten, keratinositlerin anormal farklılaşmasını düzelterek, çoğalmasını azaltabilmektedir. Ayrıca, enflamatuvar belirteçlerin ekspresyonunu da azaltmakatdır. Böylece, keratinositlerin *farklılaşması* ve *çoğalması* ile enflamasyonun belirteçleri azalır (Duvic ve ark. 1997; Yu ve ark. 2015). Tazaroten, epidermal büyüme faktörü reseptörünün ekspresyonunu azaltır. Tazarotenin enflamasyon üzerindeki etkisi, düşük interselüler adezyon molekülü-1 ve insan lökosit antijeni (HLA)-DR ekspresyonu ile gösterilmiştir (Van De Kerkhof 2006). Ayrıca, tazarotenin derideki gen ekspresyonun üzerindeki etkisi Duvic ve arkadaşları tarafından önerilmiştir. Antiproliferatif etki sağlayan ve tazaroten ile indüklenen (*tazarotene-induced gene-1 TIG-1*) üç genin (TIG 1, TIG 2 ve TIG 3) upregülasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Tazarotenin bu genlerin ekspresyonu üzerinde doğrudan etkili olduğu düşünülmektedir (Duvic ve ark. 1997). Tazarotenin deri üzerindeki gen ekspresyonunun regülasyonunun şematik gösterimi Şekil 2.6'de verilmiştir (Duvic ve ark. 1997).

Tazarotenin *Activator Protein 1* (AP1) de dahil olmak üzere diğer sinyal transdüksyon yolların üzerine azaltarak düzenleme (*down-regülasyon*) etkisi önerilmiştir. AP1 kendisi, *stromelisin-1, K6, K16, Spr-2, TGase-K ve ornitin dekarboksilaz* gibi genlerin ekspresyonu üzerinde etkili olur. Böylece deride proliferasyon ve enflamasyon azalır. Ayrıca tazaroten interferon γ etkisini antagonize ettiği için MRP-8, TGase-K, ve kornifin'nin ekspresyonu da azalır. Bu etkilerin sonucu olarak, epidermal keratinositlerin farklılaşması normalleşir (Duvic ve ark. 1997).



Şekil 2-6: Tazarotenin deri üzerindeki gen ekspresyonunun regülasyonunun şematik gösterimi

IFN: İnterferon, K6: keratin 6, MRP-8: Migrasyonu inhibe edici faktör- ilgili protein (migration inhibitory factor-related protein), ODC: Ornitin dekarboksilaz, RAR, retinoik asit reseptörü; Spr-2: küçük protein zengin protein-2 (small protein rich protein-2), TGase-K, keratinosit transglutaminaz; TIG, tazaroten ile endüklenen gen.

2.3.2.2. Tazarotenin Endikasyonları ve Tedavi Dozu

Tazarotenin topikal uygulaması birçok ülkede kronik plak psoriazis tedavisi için onaylanmıştır. Tazaroten %0,05 ve %0,1'lik topikal preparatları mevcuttur. Tedaviye %0,05'lik preparatı ile başlanması ve gerekirse konsantrasyonun arttırılması önerilir. Tazaroten tedavide akşamları günde bir kez uygulanır (Candraratna 1997; Tang-Liu ve ark. 1999; Van De Kerkhof 2006). Gebelik kategorisi X olan teratojenik bir etkin madde olan tazorotenin gebelik ve emzirme döneminde kullanılmaması önerilir. Tazaroten gebe kadınlarda ve teratojenik potansiyeli bakımından yeterli doğum kontrolü uygulamayan kadınlarda kontrendikedir. Ayrıca, güneş ışığına maruz kalmış, yeterli güneş koruması kullanmayan ve fotosensitizer kullanan veya fotodermatit hastalarda tazaroten kullanımından kaçınılması gerekmektedir (Van De Kerkhof 2006).

Tazaroten, diğer tedaviler ile özellikle topikal kortikosteroitler ve fototerapi ile kombinasyon halinde de etkilidir. Bu kombinasyonlar ile gerek etkinliği gerekse etkin maddenin hastalar tarafından toleransı artmaktadır. Bununla birlikte, cildin yanmasını önlemek için ultraviyole B (UVB) ışığının terapötik dozu düşürülmesi gerekebilmektedir (Lebwohl 2005).

2.3.2.3. Tazarotenin Yan Etkileri

Tazaroten monoterapisi ile ilgili en yaygın yan etkiler olarak deri üzerinde hafif ve orta dereceli, kaşıntı, yanma ve eritem görülmektedir. Tazaroten jelini kullanan hastaların %9-20'si istenmeyen bu tür etkilerden dolayı tedaviyi bırakmaktadır. Tazaroten topikal bir kortikosteroit veya fototerapi ile kombinasyon halinde uygulandığında da aynı yan etkiler görülmekle birlikte, tedaviye kortikosteroit ilavesinin- tek başına kullanımı ile karşılaştırıldığında- genelde tazarotenin yan etki insidansını azalttığı bildirilmiştir (Dando ve Wellington 2005).

2.3.3. Tazarotenin Farmakokinetik Özellikleri

In vitro deriden geçiş çalışmalarını takiben tazarotenin derideki esterazlarla kısmen tazarotenik asite metabolize olduğu gösterilmiştir. Ancak, deride meydana gelen bu metabolizma, plazmadaki kadar geniş ve hızlı değildir. Taze insan derisi ve insan kadavra derisini kullanarak yapılan derdien geçiş çalışmarı sonucu, *stratum corneum* ve *epidermis-dermis*'te sırasıyla tazaroten ve tazarotenik asit konsantrasyonlarının oranları sırasıyla 5: 1 ve 2: 1 bulunmuştur (Tang-Liu ve ark. 1999).

Yapılan çalışmalar oral yol ile uygulanan tazarotenin teratojenik olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, topikal deriye uygulanan tazarotenin deriden penetrasyonu ve sistemik absorpsiyonun sınırlı olduğu bilinmektedir (Dando ve Wellington 2005).

2.3.4. Tazaroten ile İlgili Literatürlerdeki Kayıtlı Çalışmalar

Tazaroten, aşırı lipofilik karakterde bir etkin maddde (log P=5,96) olduğu için topikal formülasyonlarının geliştirilmesi açısından problemli bir molekül olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle tazarotenin yeni formülasyonlarının geliştirilmesi özelikle ilacın derideki hedef bölgelere ulaşmasını sağlaması açısından önem taşımaktadır. Ancak tazarotenin yeni topikal taşıyıcılarının geliştirilmesi kapsamında bildiğimiz kadarıyla literatürde sadece mikroemülsiyonlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar görülmüştür. Nasr ve arkadaşları, tasarımla kalite (QbD) kurallarını uygulayarak tazarotenin mikroemülsiyon formülasyonlarını optimize etmişlerdir. Mikroemülsiyonlarda yağ/sürfaktan/kosürfaktan oranı ve su yüzdesi, kritik formülasyon parametreleri olarak tanımlanmıştır. Partikül boyutu, mikroemülsiyon viskozitesi, tazarotenin derideki birikimi, permeasyon ve lokal birikim verimliliğinin indeksi kritik kalite özellikleri olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile deride biriken ilaç miktarı

ve etkin maddenin topikal kullanımında güvenirliği dikkate alınarak optimum formülasyon belirlenmiş, QbD yaklaşımının formülasyon geliştirilmesindeki önemi gösterilmiştir (Nasr ve Abdel-hamid 2016).

Başka bir çalışmada da Patel ve arkadaşları, topikal uygulamaya yönelik tazaroten içeren mikroemülsiyon bazlı yeni jel formülasyonları hazırlamışlardır. Optimize edilmiş formülasyonun bileşimi optimize edilerek, tazarotenin in vitro koşullarda sıçan derisinden permeasyon kinetiğinin Higuchi modeline uyduğu gösterilmiştir. Optimize edilmiş mikroemülsiyonun jeleştirilmesi ile hazırlanan preparatın, pazardaki ürününe göre tazarotenin derideki toleransının artırılıdığı bildirilmiştir (Patel ve ark. 2016).

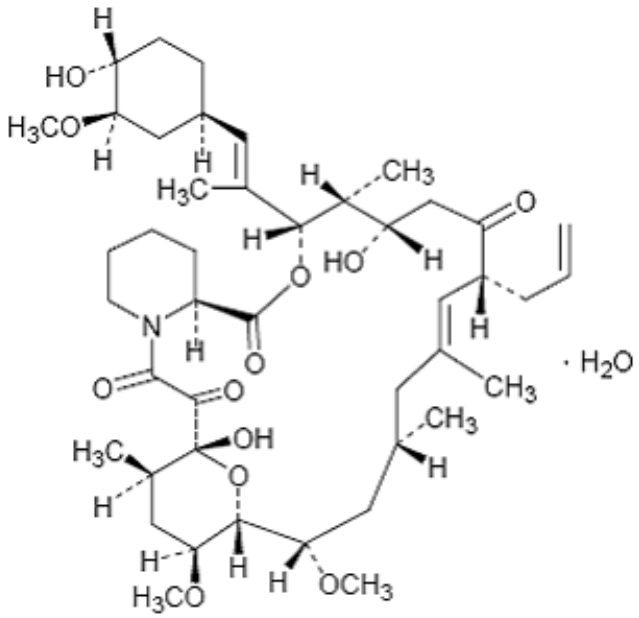
2.4. Takrolimus Hakkında Genel Bilgiler

Takrolimus FK506 olarak da bilinen önemli bir immünosupresan moleküldür. Takrolimus siklosporin A ile karşılaştırıldığında nispeten daha küçük bir moleküldür ve bağışıklık bastırıcı etkisi yaklaşık 50-100 kat in vitro ve 10-20 kat in vivo daha yüksektir (Goebel ve ark. 2011). Takrolimus *Streptomyces tsukubaensis*'ten keşfedilen lipofilik yapıda bir makrolit laktondur (Patel ve ark. 2012). Atopik dermatit tedavisi için 1999, 2000 ve 2001 yıllarında sırasıyla Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da iki yaşınn üzerindeki hastalarda kullanımı için takrolimusun topikal merhemi onaylanmıştır (Beck 2005). Takrolimus henüz topikal psoriazis tedavisi için onaylanmamasına rağmen yüz psoriazis için etkili bir antienflamatuvar olarak kabul edilmektedir (Goebel ve ark. 2011).

2.4.1. Takrolimusun Yapısı ve Fizikokimyasal Özelikleri

Takrolimus, aşırı lipofilik (log P=3,96) bir bileşiktir ve katı halde iken bir monohidrat şeklinde bulunmaktadır. Metanol, kloroform, aseton ve etil asetatta oldukça iyi çözünür. Etil eter, propilen glikol ve polietilen glikolde çözünür, ancak suda ve n-heksanda çözünmez. Takrolimus, katı halde iken, metanolde ve hafif asidik ortamda kararlıdır, ancak alkali koşullar altında bozunmaya eğilimlidir. Bu fizikokimasal özellikleri, takrolimusun ideal bir dozaj formuna dönüştürülmesini zorlaştırmaktadır (Venkataramanan ve ark. 1995; Goebel ve ark. 2011).

Takrolimusun kimyasal formülü ve fizikokimyasal özellikleri Şekil 2.7'de verilmiştir (Goebel ve ark. 2011; The United States Pharmacopeial 2013).



[3S[3R*[E(1S*,3S*,4S*)],4S*,5R*,8S*,9E,12R*,14R*,15S*,16R*,18S*,19S*,26aR*]] ,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-hexadecahydro-5,19-dihydroxy3-[2-(4-hidroksi-3-Metoksi-sikloheksil)-1-metiletenil]-14,16-dimetoksi-4,10, 12,18-tetrametil -8-(2-propenil)-15,19-epoksi-3H-pirido[2,1-c][1,4] oksaazasiklotrisiksin-1,7,20,21(4H,23H)-tetron, monohidrat

Kapalı Formülü: $C_{44}H_{69}NO_{12} . H_2O$

Molekül Ağırlığı: 822,03 g/mol

Erime Noktası: 126 ºC

Log P: 3,96 ± 0,83

Suda Çözünürlüğü: 0,00402 mg/ml

Şekil 2-7: Takrolimusun yapısal formülü ve özellikleri

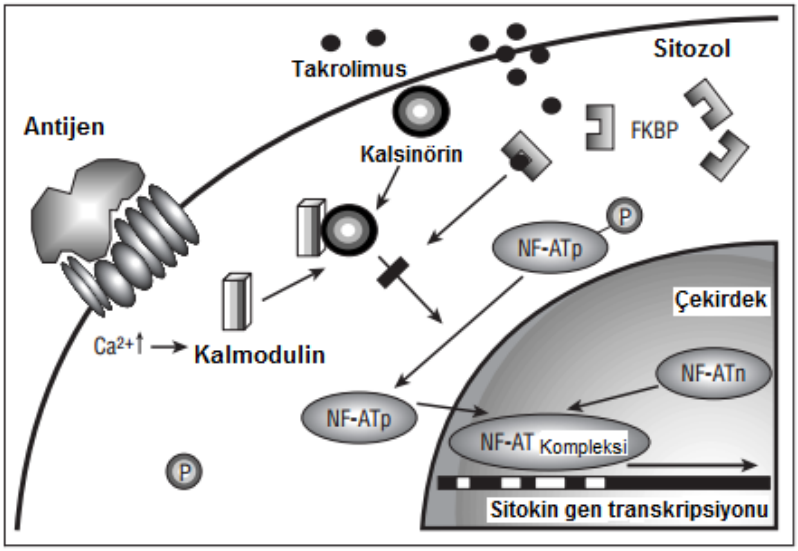
2.4.2. Takrolimusun Farmakodinamik Özellikleri

2.4.2.1. Takrolimusun Etki Mekanizması

Takrolimus topikal psoriazis tedavisinde hale onaylanmamasına rağmen yüz psoriazis için etkili bir anti-enflamatuvar olduğu gösterilmiştir (Goebel ve ark. 2011). Takrolimus yapısal olarak siklosporin A'dan çok farklı olmasına rağmen, etki meaknizması siklosporin'nın mekanizmasına çok benzerdir (Thomson ve ark. 1995). Takrolimusun topikal tedavide derideki ana hedef bölgesi dermisteki lenfositlerdir. Kalsinörin fosfataz enzimini inhibe ederek IL-2 geni transkripsiyonu inhibe eder ve böylece T-lenfosit yanıtı engellenir (Goebel ve ark. 2011).

Takrolimus; esas olarak interlökin 2 (IL-2) transkripsiyonunun engellenmesine bağlı olarak, T lenfositlerin aktivasyonunu durdurarak immünosüpresan etki gösterir. Böylece yabancı antijenlere karşı *T* lenfosit yanıtını azaltır. Takrolimus bir immünofilin'e (*FK506 bağlayıcı protein FKBP*) bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks daha sonra kalsinörin, kalsiyum ve kalmodulin ile bağlanır. Bu kompleksler kalsinörin fosfataz aktivitesinin inhibisyonuyla sonuçlanır. Buna bağlı olarak, NF-AT'a (*nuclear factor of activated T cells*) bağlı olan sitokin gen transkripsiyonu engellenir ve immün yanıt baskılanır.

Aslında, takrolimusun interlökin-2 gen transkripsiyonun, nitrik oksit sentaz aktivasyonu, hücre degranülasyonu ve apoptoz gibi kalsiyum bağımlı mekanizmaları engellediği bildirilmiştir (Thomson ve ark. 1995; Ruzicka ve ark. 1999). Ayrıca, granülosit-makrofaj kolon uyarıcı GM-CSF faktörü, tümör nekroz faktörü TNFα, interferon INFγ ve bağışıklık yanıtının gelişmesi için gerekli olan diğer interlökinler gibi çeşitli enflamatuvar mediatörleri kodlayan genlerin transkripsiyonunu kontrol eder (Ruzicka ve ark. 1999; Sehgal ve ark. 2008). Dolayısıyla, ekzojen olarak verilen sitokin yanıt bozulmadan *T* hücresi aktivasyonunun erken fazında engellenir. Ayrıca, takrolimus histaminin de mast hücrelerinden salgılanmasını ve prostaglandin sentezini engeller. Aynı zamanda, bazofil hücrelerin tarafından histamin salgılanmasını bastırır. Bu etkilerden dolayı takrolimus kaşıntıyı azaltabilir (Paulis ve ark. 1992; Griffith ve ark. 1995; Sehgal ve ark. 2008). Şekil 2.8 takrolinusun etki mekanizmasını şematik olarak göstermektedir (Ruzicha ve ark. 1999).



Şekil 2-8: Takrolimusun etki mekanizması

Takrolimus-İmmünofilin (FKBP) kompleksi, T hücre reseptör aracılı transdüksyon yolunu bloke eder. Takrolimus-İmmünofilin Kompleksi aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörünün (NF-AT) sitoplazmik altbiriminin nükleer translokasyonunu inhibe eder. Böylece NF-AT oluşumu engellenir, bunun sonucu olarak birkaç sitokin geninin transkripsiyonu bastırılır (**NF-ATn**, NF-AT'nin nükleer altbirimini belirtir; **P**, fosfat).

2.4.2.2. Takrolimusun Endikasyonları ve Tedavi Dozu

Takrolimus (FK506) güçlü immünosüpresan özelliklere sahip bir moleküldür. Karaciğer transplantasyonundan sonra organ reddinin önlenmesi tedavisinde immün yanıtı baskılayıcı olarak Nisan 1994 yılında Amerika Birleşik Devletlerin'de onaylanmıştır. Ayrıca, kalp, ince barsak ve böbrek nakli sonrasında da organ reddinin önlenmesinde kullanılmaktadır (Venkataramanan ve ark. 1995).

Dermatoloji alanında bu topikal kalsinörin inhibitörü başlangıçta atopik dermatit tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır. Takrolimusun topikal merhemi atopik dermatit tedavisi için 1999, 2000 ve 2001 yıllarında sırasıyla Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da iki yaştan büyük hastalarda kullanımı onaylanmıştır. Psoriazis tedavisinde ise yüz ve intertrijinöz için endikasyon dışı kullanımı sözkonusudur (Luger ve Paul 2007).

Takrolimusun konvansiyonel topikal kortikosteroitlerin tedavisi üzerinde; etki mekanizmasının daha seçici olması, deri atrofisine neden olmaması ve önemli bir sistemik absorpsiyon olmaması gibi üstülükleri bulunmaktadır. Yüz, boyun, kıvrımlar

ve genital bölgedeki lezyonların tedavisi için özellikle bu alanlarda daha çok yan etki gösteren kortikosteroitlere nazaran tercih edilir.

Fleksural psoriazis, seboreik, temas ve el egzaması tedavisinde takrolimusun etkinliği gösterilmiştir. *Liken planus, fasiyal lupus eritematozus, otoimmün büllöz dermatoz* ve *vitiligo* tedavisinde topikal takrolimusun etkili olduğu bildirilmiştir. Ancak bu endikasyonlarda, topikal kalsinörin inhibitörlerinin etkinliğini ve güvenliğini daha iyi anlamak için kontrollü çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Luger ve Paul 2007). Takrolimus merhemi, ince deri yerleri, yani yüz, genital bölge ve intertrijinöz bölgelerdeki psoriazis tedavisinde etkili olduğu belirtilmektedir. Yüz üzerinde psoriazis lezyonları gösteren 21 hastanın 4 hafta süre ile günde iki kez takrolimus (% 0,1) merhem oklüzyonsuz uygulandığı bir çalışmada hastaların çoğunun tedaviye tam veya iyi yanıt verdiği bildirilmiştir (Mitra ve Wu 2010).

Topikal olarak takrolimus %0,03 ve %0,1'lik merhem preparatları ile tedavide kullanılmaktadır. 2 yaş ve üstü pediatrik hastalarda günde 2 kez % 0,03'lük, yetişkinlerde ve geriatrik hastalarda ise %0,1'lik preparatı kullanılmaktadır. Gebelik kategorisi C olan bir ilaç olduğu için gebelik ve laktasyonda kullanımı önerilmez. Topikal takrolimusun UV ışığı ile birlikte tedavide kullanımı vitiligoda etkili bulunmasına rağmen, kanserojen yan etki potansiyeli nedeniyle bu kombinasyon tedavisinin uzun süre takip edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, hastalara doğal veya yapay güneş ışığına maruz kalmamaları önerilmektedir (Kawashima ve ark. 1996; Ruzicka ve ark. 1997; Sehgal ve ark. 2008).

2.4.2.3. Takrolimusun Yan Etkileri

Takrolimus topikal olarak ilk uygulamalarında deride yanma veya kaşıntı hissi görülmektedir. Grip benzeri belirtiler, baş ağrısı, öksürük ve gözlerde yanma hissi nadir görülen yan etkilerdir. UV ışınları ile birlikteliğinde karsinojenite riskinde artışı gösterilmese de, bu durum fototerapi alan psoriazis hastalarında dikkate alınmalıdır (Pradhan ve ark. 2013). Takrolimusun antipsoriatik aktivite gösterebilmesi için gerekli kan seviyesi graft reddinin önlenmesi için gerekli olana benzer olduğu için; hipertansiyon, böbrek yetmezliği, nörotoksisite ve bağışıklık sistemin baskılanması gibi yan etkilerin görülme riski yüksektir (Erdogan ve ark. 2002).

Ayrıca, takrolimus merhemin kullanımı folikülit, akne, ekzema herpesiği ve herpes simpleks gibi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Sıcaklık ve soğuğa karşı

derinin hassasiyeti ile alkol intoleransında artış da izlenmiştir. Topikal immünosüpresyona bağlı olarak kütanöz viral enfeksiyonlar izlenebilir. Takrolimus ile topikal immünmodülatör tedavinin kanser riskini artırabileceği konusunda teorik bir endişe olsa da, bugüne kadar kütanöz veya viseral kanserin riski artırabileceği kanıtlanmamıştır (Sehgal ve ark. 2008).

2.4.3. Takrolimus Farmakokinetik Özellikleri

Topikal takrolimus derinin enflamasyon durumunda yeterince emilir. %0,03-%0,1'lik merhemi uygulandıktan 3 ila 6 saat sonra en yüksek seviyeye (0,05-0,25 ng/ml) arasında ulaşır. Topikal takrolimusun sağlıklı veya hasta deriye yavaş nüfuz etmesine rağmen absorpsiyonu siklosporine göre daha yüksektir. Bu durum daha küçük molekül ağırlığı ile açıklanmaktadır (Sehgal ve ark. 2008).

Takrolimus oral yol ile verilidiğinde absorpsiyon hızı değişkenlik gösterir. Doruk plazma konsantrasyonuna 0,5 ila 6 saat arasında ulaşır. Oral biyoyaralanımı yaklaşık %25'tir. Eliminasyondan önce tamamen metabolize olur. Takrolimus kırmızı kan hücrelerine yoğun bir şekilde bağlanır. Ortalama eliminasyon yarılanma ömrü 12 saattir ve kan konsantrasyonuna dayalı olarak toplam vücut klirensı yaklaşık 0,06 L/saat/kg'dır. Takrolimusun eliminasyonu, karaciğer yetmezliği ve çoklu ilaç tedavisinde azaltılır. Takrolimus farmakokinetiğinde bireysel içi ve bireysel arası büyük değişiklik gösterir (Venkataramanan ve ark. 1995).

2.4.4. Takrolimus ile İlgili Literatürlerdeki Kayıtlı Çalışmalar

Takrolimusun lipofilik karakterde bir molekül olması ve deride daha derin dokulara ulaşması gerektiği için yeni ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu kapsamda; lipit matristeki ilacın çözünürlüğünü artırmak için lipofilik çözücüler kullanılarak deriye uygulanmak üzere takrolimus yüklü modifiye edilmiş lipit nano-taşıyıcılar (NLC) hazırlanmıştır. Bu çalışmada; lipidin modifikasyonu ile ilacın enkapsülasyon etkinliği artırılmıştır. Ayrıca taşıyıcıdaki toplam lipit konsantrasyonunun azaltılması stabilite artırılmıştır. Modifye edilmiş NLC'lerden hazırlanan jel formülasyonları kontrol formülasyonu ile karşılaştırıldığında, takrolimusun deriden geçişi önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca modifye edilmiş NLC formülasyonunun deri üzerindeki tahriş edici etkisinin daha düşük olduğu gösterilmiştir. Gama sintigrafisi kullanılarak bu taşıyıcının sıçanlarda in vivo etkisi

derideki hedef bölgesinde radyoaktivite lokalize kalması ile doğrulanmıştır (Pople ve Singh 2011).

Başka bir çalışmada Li ve arkadaşları tarafından takrolimus yüklü etozomlar hazırlanmıştır. Takrolimusun kolesterol ile hazırlanan klasik lipozomlara kıyasla etozomlarda etkin maddenin daha yüksek enkapsülasyon etkinliğinin olduğu ve derinin tabakalarında daha fazla ilacın lokalize olduğunu gösterdi. BALB/c fare modelinde, 2,4-dinitrofluorobenzen'in tekrarlanan topikal uygulanması sonrasında farelerde kulak şişmesi indüklenmiş ve topikal uygulamayı takiben takrolimus içeren etozomların klasik lipozomlara ve ticari merheme kıyasla bu modelde indüklenen kulak şişmesini daha etkili bir şekilde düşürdüğü gösterilmiştir (Li ve ark. 2012).

Diğer bir çalışmada, takrolimus yüklü transferzomların jel formüalsyonları hazırlanmış ve bu formülasyonun etkinliği takrolimusun ticari merhemi (Protopic®) ve konvansiyonel lipozomunu içeren jeli ile karşılaştırılmıştır. Tween 80 ile hazırlanan transferzomların, en yüksek enkapsülasyon etkinliği gösterdiği saptanmıştır. Takrolimusun lipozom içeren jeli ve ticari merhemi ile karşılaştırıldığında, optimize edilen transferzom içeren jelinin epidermis ve dermis'te en fazla etkin madde birikimi verdiği saptanmıştır (Lei ve ark. 2013).

Goebel ve arkadaşları da, takrolimusun derideki lokalizasyonu arttırmak için takrolimus içeren koloidal taşıyıcı sistemlerden mikroemülsiyon formülasyonlarını geliştirmişlerdir. *İn vitro* penetrasyon çalışması verileri ile optimize edilen takrolimusun mikroemülsiyon formülasyonlarının ticari merhemine göre derinin derin tabakalarında en fazla ilaç miktarının biriktiğini göstermişlerdir (Goebel ve ark. 2011).

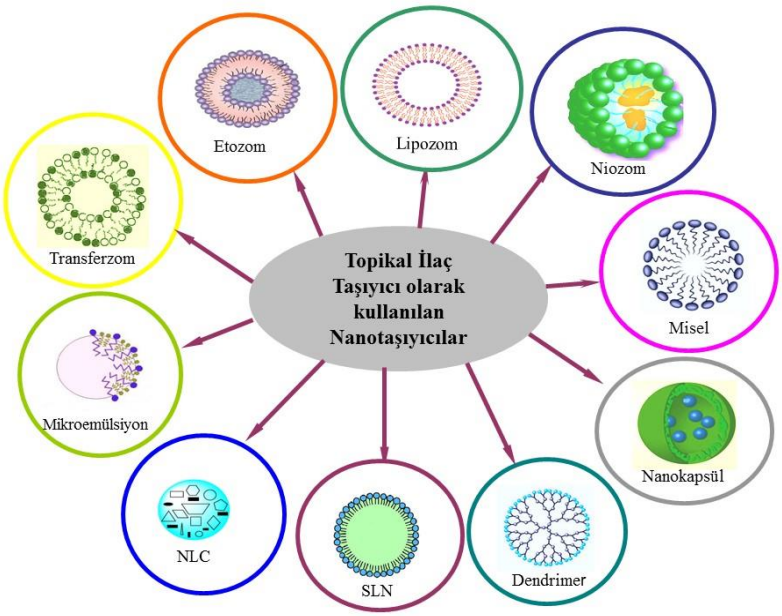
Başka bir çalışmada, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu metoksi-poli (etilen glikol) -diheksil ikameli polilaktit (MPEG-diheks-PLA) diblok kopolimeri ile takrolimusun polimerik miselleri hazırlanmıştır. Takrolimusun ticari merhem preparatı ile karşılaştırıldığında, geliştirilen miseller taşıyıcıdan takrolimusun *stratum corneum*, canlı epidermis ve üst dermis tabakalarındaki birikiminin yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca misellerin derideki dağılımı ve moleküler penetrasyon yolları CLSM ile araştırılmış ve misellerin derideki kıl foliküllerinde biriktiği göserilmiştir (Lapteva, Mondon ve ark. 2014).

2.5. Psoriazis Topikal Tedavisine Yönelik Nanotaşıyıcıların Önemi

Hafif ve orta şidetli psoriazis tedavisinde ilk yaklaşım olarak topikal tedavi ilk seçenektir. Öte yandan deriye topikal uygulandıklarında ilaç molekülerinin derinin hedef tabakalarında etkin konsantrasyonda birikimi açısından *stratum corneum* tabakası önemli bir bariyerdir. Psöriatik derinin topikal tedavisini sağlamak için de derinin hedef bölgesinde yüksek ilaç seviyelerinin sağlanması ve yan etkilerinin azaltılmasının sağlanması gerekmektedir (Agrawal ve ark. 2015). Ancak, merhemler, losyonlar ve kremler gibi konvansiyonel topikal formülasyonların topikal tedavideki çeşitli kısıtlamaları bulunmaktadır. Özellikle deri hastalıklarında topikal tedavisinin başarısı, etkin maddelerin derinin hedef etki bölgesine lokal ve doğrudan uygulanmasına bağlıdır (Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013).

Nanoteknoloji alanındaki ilerlemeler farmasötik alan da nano ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yol açmıştır (Moghassemi ve Hadjizadeh 2014). Etkin maddelerin korunması ve hedef bölgelere daha yüksek dozun ulaşmasının sağlanması nanotaşıyıcıların en önemli avantajları arasında yer almaktadır (Marianecci ve ark. 2014). Nanotaşıyıcılar, uygulanan ilaç molekülleri için deride bir rezervuar oluşturarak, lokalizasyonlarının arttırılması sağlayabilmektedir (Gupta ve ark. 2012). Konvansiyonel formülasyonların kısıtlamalarının aşılması ve topikal uygulamanın etkinliğini arttırılması için, yeni nano boyutlu ilaç taşıyıcılarının geliştrilmesi son yıllarda kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Cosco ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2013; Rahman ve ark. 2015; Güngör ve Rezigue 2017; Roberts ve ark. 2017). Şekil 2.9'de topikal uygulamaya yönelik geliştirilmiş nanotaşıyıcılar gösterilmektedir (Güngör ve Rezigue 2017).

Bu yaklaşımla, psoriazis tedavisinde kullanılan ilaç moleküllerinin yeni ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesine yönelik de çalışmalar yürütülmektedir. Lipozom, niozom, etozom, transferzom gibi veziküler sistemler ile mikroemülsiyon, nanopartikül, mikroküre ve misel taşıyıcı sistemleri geliştirilerek, topikal uygulan ilaçların etkinliğinin arttırılması, derinin hedef tabakalarındaki ilaç birikiminin sağlanması, uygulama sıklığının azaltılması ile ilaçların topikal biyoyararlanımın artırılması öngörülmektedir (Cosco ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2013; Rahman ve ark. 2015; Güngör ve Rezigue 2017).



Şekil 2-9: Topikal ilaç taşıyıcı olarak kullanılan nanotaşıyıcılar

NLC: Lipit Nano-Taşıyıcılar, SLN: Katı Lipit Nanopartiküller

Aşağıda tez kapsamında geliştirilen nanotaşıyıcı sistemlerden vesiküler ilaç taşıyıcılar ve özellikle ilaçların deriden geçişinin iyileştirlmesinde son yıllarda araştırılan vesiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin genel özellikleleri irdelenmiştir.

2.6. Veziküller İlaç Taşıyıcı Sistemler

Veziküller taşıyıcı sistemler; fosfolipitler, kolesterol ve/veya diğer sürfaktanlardan hazırlanabilen çift katmanlı küresel yapılardır (Pradhan ve ark. 2013). Veziküler sistemler; biyouyumlu ve biyoparçalanabilir olması, etkin maddelerin metabolik bozunma sürecinden korunmasını ve taşıyıcı sistemden salımlarının kontrol edilmesi ile toksisitelerinin azaltılmasını sağlayabilme özelliklerine sahip olmaları nedeni ile topikal ve transdermal uygulamada en dikkat çeken taşıyıcı sistemlerdir. Bu sistemlerin etkinliği; formülasyon bileşenleri, veziküllerin büyüklükleri, yükleri, çifte tabaka sayıları gibi özellikleri ile uygulama koşullarına bağlıdır (Maibach 2005; El Maghraby ve ark. 2006; Kumar ve ark. 2012; Ahmed 2015).

Konvansiyonel lipozomlar deriden permeasyonlarının zayıf olmaları buna bağlı olarak da *stratum corneum*'un yüzeyinde ve üst kısımlarında birikimleri nedeniyle topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok fazla tercih edilmemektedirler. Veziküllerin bileşimlerinde yapılan bazı değişiklikler ile etkin maddeleri derinin daha

derin tabakalarına taşıyabilen sistemler olarak etozomlar ve transferzomlar (ultradeforme olabilen lipit bazlı elastik veziküller) tasarlanmıştır (Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Ascenso ve ark. 2015). Son yıllarda da transetozomlar da deriye uygulamaya yönelik ilaç taşıyıcı sistlemler olarak araştırılmaktadır (Song ve ark. 2012).

2.6.1. Veziküler Sistemlerin Hazırlama Yöntemleri

2.6.1.1. Klasik Lipozomların Hazırlanması

Lipozomların hazırlanmasında en yaygın kullanılan yöntem ince film hidrasyon yöntemidir, ters fazlı buharlaştırma ve eter enjeksiyon yöntemi gibi başka yöntemler de kullanılabilir. Aşağıda bu yöntemler kısaca açıklanmıştır.

İnce Film Hidrasyon Yöntemi: Fosfolipit veya fosfolipit karışımı, metanol veya kloroform gibi uygun bir organik çözücü içerisinde çözündürülür. Organik çözücü, düşük basınç altında uçurulur ve çözücünün tamamen uzaklaştılımasını sağlamak için vakum altında bekletilir. Oluşan ince lipit film sulu bir ortamda yeniden dağıtılır ve homojen bir dağılım oluşturması için sonike edilir. Veziküllerin büyüklüğü uygulanan sonikasyon veya ekstrüzyon işlemleri ile azaltılabilir (El Maghraby ve ark. 2001; Pathak ve Thassu 2009; Moghassemi ve Hadizadeh 2014).

Ters Fazlı Buharlaştırma Yöntemi: Fosfolipitlerin organik fazda çözündürülmesi ve sulu faz eklenmesi ile yağ içinde su emülsiyonu hazırlanır. Organik faz daha sonra düşük basınç altında yavaş yavaş uzaklaştırılır. Sıkışmış (entrapped) sulu çekirdekli büyük unilamellar veziküller oluşur (Pathak ve Thassu 2009; Moghassemi ve Hadizadeh 2014).

Eter Enjeksyon Yöntemi: Lipit eter içinde çözündürülür ve sulu ortama çok yavaş bir hızda enjekte edilir. Oluşan büyük veziküller jel filtrasyonu ile uzaklaştırılır (Pathak ve Thassu 2009; Moghassemi ve Hadizadeh 2014).

2.6.1.2. Deforme Olabilen Lipozomların Hazırlanması

Deforme olabilen lipozomlar klasik lipozomların hazırlamasında kullanılan yöntemler üzerinde bazı değişiklikler yapılarak hazırlanabilmektedirler. Genellikle transferzomlar ve etozomların hazırlanmaları için literatürde mevcut olan yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

Transferzomların hazırlanmasında genelde iki yöntem kullanılır. Bu iki yöntemin üzerinde bazı değişiklikler yapılarak kullanılmıştır (Kumar ve ark. 2012). Bu yöntemler aşağıda kısaca anlatılmıştır:

***İnce Film Hidrasyon Yöntemi*:** Bu yöntem daha önce anlatıldığı gibi yanlızca kenar aktivatörü ve fosfolipit metanol veya kloroform gibi uygun bir organik çözücü içerisinde çözündürülür (Cevc ve ark. 1997; El Zaafarany ve ark. 2010; Kumar ve ark. 2012).

***Vorteksleme-sonikasyon Yöntemi*:** Bu yöntemde fosfatidilkolin, kenar aktivatörü, suda veya fosfat tamponunda karıştırılır ve süt görünümlü süspansiyon elde etmek için vortekslenir. Bu süspansiyon sonike edilir, ardından polikarbonat membrandan geçirilerek ekstrüzyonu yapılır (El Zaafarany ve ark. 2010; Kumar ve ark. 2012).

Etozomların hazırlanmasında aşağıdaki yöntemler de kullanılabilmektedir

***İnce Film Hidrasyon Yöntemi*:** Klasik lipozom hazırlama yöntemine benzer yanlızca bu yöntemde lipit film hidroetanolik bir çözelti ile hidrate edilir (Verma ve Pathak 2010; Abdulbaqi ve ark. 2016).

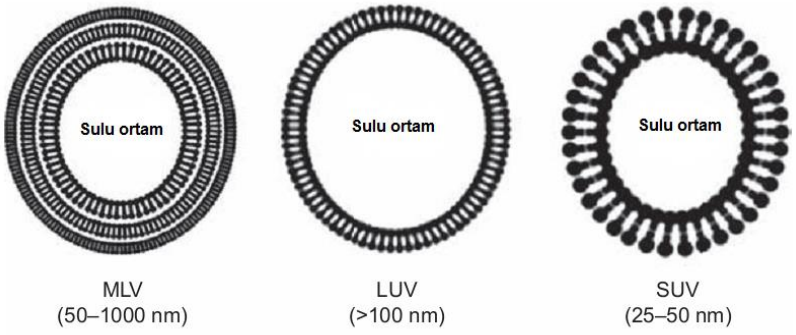
Klasik Soğuk Yöntem: Etozomal sistemlerin hazırlanması için en basit ve en yaygın kullanılan yöntemdir ve gerekirse azot altında yapılabilmektedir. Yöntem ilk defa, Touitou tarafından 1996'da tanıtılmıştır. Organik fazın ve sulu fazın ayrı ayrı hazırlanmasını gerektirir. Organik faz, fosfolipitlerin etanol içerisinde çözündürülmesiyle hazırlanır. Sulu faz organik faza çok yavaş bir akış halinde damla damla ilave edilir veya 175 ile 200 µL/ dk. sabit oranda bir şırınga pompası kullanılarak eklenir. Karışım manyetik bir karıştırıcı kullanılarak 700-2000 rpm hızda karıştırılır. Karıştırma, 5-30 dakika boyunca gerçekleşir (Touitou, dayan ve ark. 2000; Verma ve Pathak 2010; Tanrıverdi ve Özer 2013; Abdulbaqi ve ark. 2016).

Etanol Enjeksiyon Sonikasyon Yöntemi: Bu yöntemde, etanol içinde çözündürülmüş fosfolipitten oluşan organik faz, bir şırınga sistemi kullanılarak, 200 µL/ dk.'lık bir akış hızı ile sulu faza enjekte edilir ve daha sonra, bir ultrasonik prob ile 5 dakika boyunca homojen hale getirilir (Zhaowu ve ark. 2009; Verma ve Pathak 2010; Liu ve ark. 2011; Abdulbaqi ve ark. 2016).

Sıcak Yöntem: Bu yöntemde ilk olarak bir kapta fosfolipit su içinde dağıtılır, daha sonra koloidal bir süspansiyon elde etmek için 40°C'de bir su banyosuna yerleştirilir. Başka bir kapta (vessel), etanol 40 °C'ye ısıtılır ve ardından mekanik veya manyetik bir karıştırıcı kullanılarak kesintisiz karıştırma altında damla damla fosfolipit dispersiyonuna ilave edilir. İlaç molekülü, hidrofilik/hidrofobik özelliklerine dayanarak organik veya sulu fazda çözündürülür (Verma ve Pathak 2010; Abdulbaqi ve ark. 2016).

2.6.2. Lipozomlar

Lipozomlar, farklı yapıdaki lipitlerin kullanılması ile hazırlanan, bir veya iç içe geçmiş birden fazla lipit çifte tabaka içeren, iç kompartmanında sulu faz bulunan küresel veziküllerdir. Lipozomlar ilk olarak Bangham tarafından 1960'larda keşfedilmiştir. Lipozomların ana bileşeni genellikle fosfolipitlerdir, ayrıca kolesterol de formülasyonlarına katılabilmektedir (El Maghrabay ve ark. 2006; El Maghraby ve ark. 2008). Lipozomdaki lipitler, fosfatidilkolin (lesitin), fosfatidiletanolamin, fosfatidilgliserol, fosfatidilserin ve fosfotidiliyonozit içeren doğal veya sentetik fosfolipitlerdir. Sulu bir ortam ile karıştırıldığında, fosfolipitlerin fosfat grupları kendiliğinden hidrofilik çevreye tek katmanlı veya çok katmanlı çift tabakalı veziküller oluştururlar (Şekil 2.10) (Pathak ve Thassu 2009).



Şekil 2-10: Lipozom tipleri, MLV; multilamellar vezikül, LUV; büyük unilamellar vezikül, SUV; küçük unilamellar vezikül

Lipozomların ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasının en önemli nedenleri arasında; farklı lipofiliteye sahip etkin maddeleri taşıyabilmeleri ve yapı olarak biyolojik membranlara benzerlik göstermeleri başta gelmektedir. Biyolojik olarak

geçimli ve biyoparçalanabilir özellikte olan lipozomlar immunojenik ve toksik etki göstermezler (Pradhan ve ark. 2013).

Lipozomlar, kozmetik maddelerin epidermise salımı amacıyla tasarlanmış birçok ticari ürünün bileşiminde yer almaktadır. Lipozomlarının kozmetik ürünlerde kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Amaç, aktif bileşenlerin derinin en dış tabakalarında birikimini arttırmaktır. Örneğin, sulu bazlı güneş koruyucuların ürünlerine UV filtreleri içeren lipozom eklenmesi, deri yüzeyinde iyi bir dayanıklılık sağlamakta ve böylece ürünün kolayca yıkanmasını önlemektedir. Lipozomların kendileri, kozmetik olarak kullanıldığında, endojen *stratum corneum'*un lipitlerinin yenilenmesi arttırır, ayrıca nemlendirme etki sağladığı için derinin kuruluğunu azaltır (Wu ve Guy 2009).

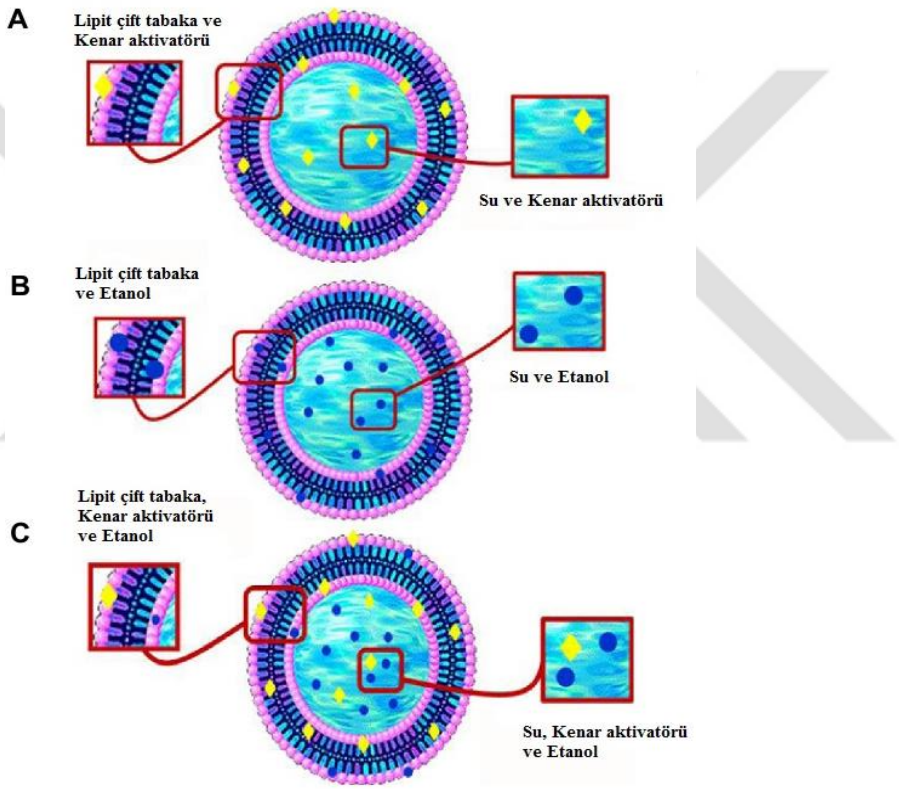
Ancak, lipozomlar deriye uygulandıklarında daha çok *stratum corneum'*da biriktikleri için derinin alt hedef tabakalara geçmeleri zayıf olduğundan dolayı topikal ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok fazla kullanılamamaktadır. Son yıllarda, lipozomlar da transdermal ilaç taşıyıcı sistem olarak denenmektedir. Eroğlu ve ark. hazırladıkları kortikosteroit ilaçların içeren lipozomal jelin atopik dermatit tedavisinde etkili ve güvenli bir taşıyıcı olduğunu göstermişlerdir (Eroğlu ve ark. 2016).

2.6.3. Elastik (Ultradeforme olabilen) Veziküller

Transferzomlar, etozom, ve transetozomlar elastik yapıdaki (ultradeforme olabilen) veziküler sistemlerdir. Bu elastik veziküllerin hazırlanması için fosfolipitler, etanol, safra tuzları ve bir çok yüzey aktif madde kullanılmaktadır (Jain ve ark. 2007; Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Ascenso ve ark. 2015).. Bu sistemler topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak oldukçe önem kazanmıştır. Konvansiyonel lipozomlar ile karşılaştırıldığında en önemli üstünlükleri; *stratum corneum*'u bütünlüklerini koruyarak geçebilmeleri ve bu şekilde gerek hidrofilik gerekse hidrofobik etkin maddelerin lokal ve sistemik taşınmalarını sağlamaları ve topikal tedavide hedef doku olan derideki ilaç lokalizasyonunu iyileştirmeleri olarak sıralanmaktadır (Celia ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015).

Etozomlar, fosfolipitler, su ve etanolden oluşurken, transferzomlar genel anlamda fosfolipit matriks içinde kenar (edge) aktivatörleri taşıyan elastik yapılardır. Deri yüzeyine uygulandıklarında bu elastik veziküller *stratum corneum*'un hücrelerarası lipit tabakaları arasından transepidermal su-aktivite değişimi sayesinde bozulmadan

geçebilmektedir (Cevc ve Blume 2001; Verma ve Pathak 2010; Zhang ve ark. 2012). Transferzomlar deriden geçişte oldukça başarılı olmalarına rağmen, özellikle lipofilik etkin maddelerin *stratum corneum* tabakasını geçerek canlı epidermise ulaşabilmeleri ve böylelikle daha etkili bir tedavi sağlanabilmesi için içerdikleri etanol miktarı arttırılarak, yüksek oranda etanol içeren transetozomlar hazırlanmıştır (Song ve ark. 2012; Abdulbaqi ve ark. 2016). Şekil 2.11'de elastik veziküllerin yapısı gösterilmektedir (Ascenso ve ark. 2015).



Şekil 2-11: Ultradeforme edilebilen veziküllerin şematik gösterimi, (A) Transferzom (B) etozom (C) transetozom

2.6.3.1. Transferzomlar

1992'de Cevc ve Blume tarafından ilk defa tanımlanan transferzomlar (transferzom, a trademark of IDEA AG, Munich, Almanya), fosfolipitler ve tek zincirli sürfaktanlardan oluşan veziküller ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Transferzomlar, ultradeforme olabilen veziküllerin ilk kuşağını temsil etmektedir. Deforme olabilen

lipozomlar olarak da isimlendirilen transferzomlar bir “kenar aktivatörü (*edge activator*)” kullanılarak hazırlanmaktadır. Tek zincirli bir lipit ya da bir yüzey etken madde de olabilen kenar aktivatörlerinin, transferzomların *stratum corneum*’un lipit çifte tabakaları arasından bütünlüklerini koruyarak geçebilecek düzeyde esnek olmasını sağladığı da öne sürülmektedir (Jain ve ark. 2003; Cevc 2004; Elsayed ve ark. 2007).

Kenar aktivatörü olarak sıklıkla; Tween 20, Tween 60, Tween 80, Span 60, Span 65, Span 80, dipotasyum glisirhizinat, sodyum kolat veya sodyum deoksikolat gibi yüzey etken maddeler nanoboyutlu (yaklaşık olarak 100 nm çapında) veziküllerin oluşturulması için kullanılmaktadır (Jain ve ark. 2003; Cevc 2004; Elsayed ve ark. 2007; Ascenso ve ark. 2015; Morilla ve Romero 2015).

Transferozomlar bileşimlerinde farmasötik olarak kabul edilebilir yardımcı maddeler içermektedir. Biyolojik olarak uyumlu, parçalanabilir bir taşıyıcı içinde enkapsüle edilen etkin maddeyi metabolik bozunmadan koruyabilmektedirler. Aynı zamanda terapötik moleküllerin derinin derin tabakalarına taşınmasını sağlarlar. Bu veziküllerin en önemli özelliği; yüzey etken maddenin varlığından kaynaklanan fosfolipit çift katmanını zayıflatması ve esnekliklerine bağlı olarak da vezikülün ultradeforme olmasıdır. Özellikle deriye uygulandığında, bu veziküllerin esnekliği, vezikülün kopma ihtimalini en aza indirmektedir. Transferzomların, peptitlerin ve terapötik ilaçlar, analjezikler, anestezikler, kortikosteroitler ve hormonların deriden geçişi için avantaj sağladıkları bulunmuştur (Wu ve Guy 2009; Ahmed 2015; Ashtikar ve ark. 2016).

Transferzomların uygulaması herhangi bir işlem gerektirmemektedir ve örtücü olmayan bir yöntemle uygulanabilmektedirler. Derinin hidrasyonu veya ozmotik kuvvetinden dolayı *stratum corneum*'daki çok katmanlı lipit matristen geçebildikleri öne sürülmektedir (Elsayed ve ark. 2007; Wu ve Guy 2009; Kumar ve ark. 2012; Ashtikar ve ark. 2016).

Transfersomlar, henüz büyük ölçekte üretimi yapılmış ticari bir preparatı pazarda bulunmamaktadır. Ayrıca oksidatif bozunmaya yatkınlıkları nedeniyle kimyasal olarak da karasızdır. Ayrıca, doğal fosfolipitlerin saflığının olmaması, transferzomların ilaç taşıyıcı sistemleri olarak pazarda yer almasını kısıtlayan bir diğer kriterdir (Kumar ve ark. 2012).

2.6.3.2. Etozomlar

Etozomlar, Touitou ve arkadaşları tarafından 1997'de geliştirilen deforme olabilen veziküller olarak tanımlanır. Yapılarında fosfolipitler, su ve yüksek miktarda etanol içeren yaklaşık 150-200 nm boyutunda veziküler sistemlerdir. Yüksek deformasyonları nedeniyle aynı zamanda elastik nanoveziküller olarak da adlandırılırlar.

Fosfolipit olarak soya fasulyesi ve yumurta gibi doğal yarı sentetik ve sentetik kaynaklardan elde edilen lipitler %0,5-10 konsantrasyon aralığında kullanılır. Etozomların da fosfatidiletanolamin, fosfatidilinositol, fosfatidilkolin ve hidrojenlenmiş fosfatidilkolin sıklıkla kullanılır (Touitou, Godin ve ark. 2000; Cevc ve Vierl 2010; Ascenso ve ark. 2015). Etozomların yapısında %20-45 oranında yer alan etanol bu sistemlerin klasik lipozomlara oranla daha elastik bir yapıda olmasını sağlar. Ayrıca etozomlar, *stratum corneum* lipit moleküllerinin polar baş grupları ile etkileşerek lipitlerin erime derecesini düşürür ve lipit tabakanın akışkanlığını arttırırlar. Etanol negatif yüzey yükü sağladığından vezikküllerin stabilitesine de yardımcı olmakta ve agregasyonu önlemektedir (Verma ve Pathak 2010).

Etanolün, kararlı durumda yaklaşık olarak 1 mg/cm^2/saat akış ile insanın derisine nüfuz ettiği ve birçok çalışmada da farklı etkin maddelerin deriden geçiş hızını arttırdığı gösterilmiştir (Cosco ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Li ve ark. 2012). Etozomlar, geniş ve çeşitli ilaç gruplarının (peptitler, protein molekülleri) verilmesine yönelik bir platform oluşturmuştur. Farmasötik, veterinerlik ve kozmetik alanlarında çeşitli uygulamaları bulunmaktadır (Esayed ve ark. 2007; Wu ve Guy 2009; Verma ve Pathak 2010; Ashtikar ve ark. 2016).

Etozomlar etki transdermal ve dermal taşıyıcı sistem olarak kabul edilmektedir. Bileşimlerinde bulunnan madddeler nedeniyle hasta uyuncu yüksek ve düşük risk profiline sahip taşıyıcı sistemler olarak kabul edilirler. Etozomlar jel veya krem gibi bir yarı katı bir dozaj formu olarak formüle edilebilirler. Bileşimlerinde bulunan etanol etkili bir penetrasyon arttırıcıdır. Etanol, vezikküllerin boyutu, zeta potansiyeli, kararlılığı, enkapsülasyon etkililiği ve deri geçirgenliği bakımından önemli özellikler sağlayarak etozomlar için bazı üstünlükler sağlamaktadır. Etanolün optimum konsantrasyonda kullanılması etozomların boyutunun enkapsülasyon etkinliği açısından önem taşımaktadır (Rao ve ark. 2008; Abdulbaqi ve ark. 2016). Ayrıca, etanol vesiküler

sistemin net yükünü değiştirebilmekte ve dolayısı ile sterik bir stabilizasyon sağlayarak vesikülün boyutunu düşürebilmektedir. Vezikülün yükü; stabilitesi ve vezikül-deri etkileşimini etkileyebilen önemli bir parametredir. Etozomlarda yüksek konsantrasyonda etanol bulunması vezikülerin yükünü değiştirebilmektedir (Touitou, Dayan ve ark. 2000; Rao ve ark. 2008; Abdulbaqi ve ark. 2016). Dayan ve Touitou, etanol konsantrasyonunun artmasıyla boş etozomların negatif yükünün arttırdığını göstermişlerdir (Dayan ve Touitou 2000). Etanol, etozomların yüzeyi için negatif yük sağlayabilir; elektrostatik itme nedeniyle de vesikülerin bir araya toplanmasını önleyerek veziküllerin fiziksel stabilitesini artırmakatdır (Dubey ve ark. 2007; Verma ve Pathak 2012). Etanol ayrıca etozomların enkapsülasyon etkinliğini de artırabilmektedir (Abdulbaqi ve ark. 2016).

2.6.3.3. Transetozomlar

Transetozomlar, transferzomlar ve etozomların özelliklerini birarada içeren veziküler ilaç taşıyıcı sistemelerdir. Daha yeni ultradeforme olabilen veziküler sistemler olarak transetozomlar ilk defa Song ve ark tarafından 2012'de tanımlanmıştır. Transetozomlar bir kenar aktivatörü ile birlikte yüksek oranda etanol (% 30'a varan) ile tanımlanan lipit yapılı ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Song ve ark. 2012). Transetozomlar, etozomal sistemlerin yeni bir jenerasyonu olarak da sayılmatadır (Albulbaqi ve ark. 2016). Klasik etozomların formülasyonundaki temel bileşenlere ilaveten bir penetrasyon arttırıcı veya bir kenar aktivatörü (yüzey etken madde) içerir. Transetozomlarda, etanol ve kenar aktivatörün kombinasyonuna bağlı olarak veziküllerin lipit çift katmanında bir yeniden düzenlenme (rearrangment) olabilir.

Transetozomlar, hem transferomlarının hem de etozomların avantajlarını sağlayabilmektedir. Transetozomlar düzensiz küresel bir şekil gösterdi ve hem vesikül esnekliğinde hem de deri permeasyon/penetrasyon çalışmalarında yüksek değerler vermiştir (Song ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Abdulbaqi ve ark. 2016). Birçok araştırmacı klasik etozomlara göre transetozomların üstün olduklarını göstermiştir (Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Garg ve ark. 2017). Daha iyi özelliklere sahip etozomal sistemler üretmek için farklı kenar aktivatör ve penetrasyon arttırıcı tipleri araştırılmıştır.

Tablo 2.3'te klasik etozomlar ve transetozomların özelliklerinin ilk süspansiyon halindaki karşılaştırmasını göstermektedir (Abdulbaqi ve ark. 2016).

Tablo 2-3: Klasik etozomların ve transetozomların ilk süspansiyon formlarındaki karşılaştırılması

Parametre	**Klasik Etozomlar**	**Transetozomlar**
Bileşim	Fosfolipitler, Etanol Su, ilaç	Fosfolipitler, Etanol, Kenar aktivatörü veya penetrasyon arttırıcı, Su, ilaç
Morfoloji	Küresel	Düzenli veya düzensiz küresel şekiller
Boyut	Klasik lipozomlardan daha küçük	Boyut kullanılan penetrasyon arttırıcı veya kenar aktivatörün türüne ve konsantrasyonuna göre değişir
Zeta potansiyel	Negativ yüklü	Pozitiv veya negativ yüklü
Enkapsülasyon etkinliği	Klasik lipozomlardan daha yüksek	Tipik olarak klasik etozomlardan daha yüksek
Deri permeasyonu	Tipik olarak klasik lipozomlardan daha yüksek	Tipik olarak klasik etozomlardan daha yüksek
Stabilite	klasik lipozomlardan daha stabil	Belirgin bir eğilim saptanmadı

Tablo 2.4'te son yıllardaki transetozomların üzerindeki yapılan çalışmalar ve formülasyondaki bileşenleri gösterilmektedir.

Tablo 2-4: Son yıllarda yapılan transetozom çalışmaları ve kullanılan bileşenler

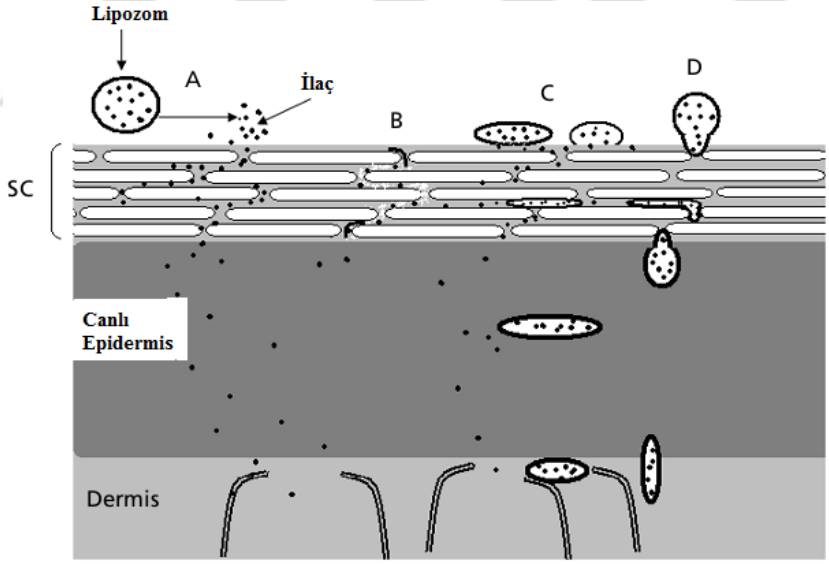
İlaç	Fosfoslipit	Kenar Aktivatörü veya Penetrasyon Arttırıcı	Etanol	Kaynak
Vorikonazol	%3 Lipoid S100	Tween80, Sodyum taurokolat, Oleik asit %0,53	%30	(Song ve ark. 2012)
Selekoksib	%4,4 1-α-fosfatidilkolin	Tween 20 %0,66	%35	(Bragagni ve ark. 2012)
Testosteron propionat	%3 Soya fasulyesi fosfatidilkolin	Cremophor EL-35 %0,5-1,5	%40	(Meng ve ark. 2013)
E Vitamini, Kafein	%10 a/h Soya fasulyesi fosfatidilkolin S 100®	%2,3 Sodyum kolat , %1,8 Span 20	%30	(Ascenso ve ark. 2015)
Ketokonazol	%3,6 Soya fasulyesi fosfatidilkolin	Sodyum dodesil sülfat %0,8	%20	(Guo ve ark. 2015)
İmikimod	%3,6 Soy phospholipid	Sodyum dodesil sülfat Sodyum deoksikolat Oleik asit %0,8	%20	(Ma ve ark. 2015)
1- (1-Naftil) piperazin	%10 Soya fasulyesi fosfatidilkolin	Sodyum kolat %1,3	%30	(Catarina ve ark. 2016)
Paeonol	%3 Soya fasulyesi fosfatidilkolin	Tween 80 %1,5	%30	(Chen ve ark. 2017)
Piroksikam	% 2-5 Soya fasulyesi fosfatidilkolin 70 (SPL)	Span 80 SPL/S80= 85:15 w/w	%0-40	(Garg ve ark. 2017)

2.6.4. Veziküler Sistemlerin İlaçların Deriden Geçişini Arttırma Yaklaşımları

Konvansiyonel veziküller olarak lipozomlar deriye uygulandıktan sonra deri yüzeyine adsorbe olabilmektedirler. Ancak, lipozomların deriden permeasyonlarının oldukça zayıf olması, daha çok *stratum corneum*'un yüzeyinde ve derinin üst kısımlarında birikmeleri, agregasyon ve veziküllerin füzyonu gibi nedenlerden dolayı topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok fazla tercih edilmemektedir.

Lipozomların *stratum corneum*'un üst kısımlarında ve foliküllerde birikme eğilimi ve daha derin dokulara en az düzeyde penetre olmaları gerek büyüklüklerine gerekse esneklikten yoksun olmalarına bağlanmıştır (Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015; Abdulbaqi ve ark. 2016; Garg ve ark. 2017).

Lipozomların ilaç moleküllerinin deriden geçişini artırmasına yönelik farklı yaklaşımlar öne sürülmektedir. Lipozomların deriden geçişi için öngörülen mekanizmalar Şekil 2.12'de özetlenmiştir (El Maghraby ve ark. 2006).



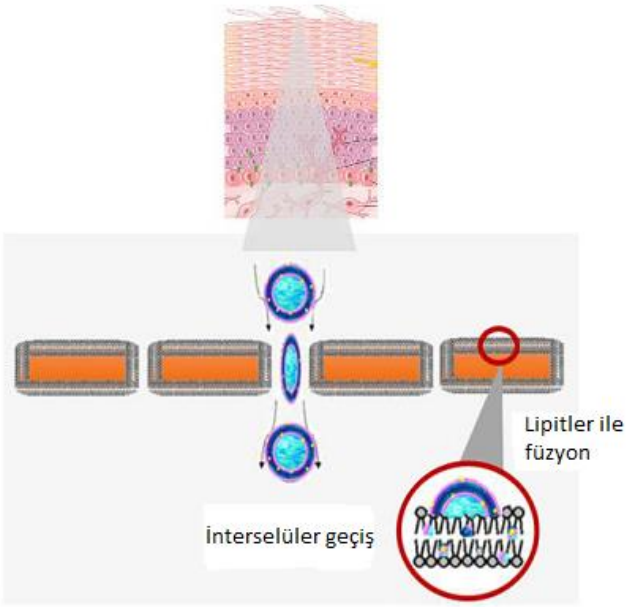
Şekil 2-12: Lipozomların deri üzerindeki etki mekanizmaları

A serbest ilaç mekanizması, B Lipozomların bileşenlerinin penetrasyon arttırıcı etkisi C Veziküllerin adsorpsiyonu ve / veya stratum corneum (SC) ile füzyonu, D lipozomların bozulmadan deriden geçişi.

Birinci yaklaşım; serbest ilacın geçişine dayanan geçiş mekanizmasıdır. Bu yaklaşımda; ilaç moleküllerinin öncelikle lipozomlardan salımının ve bunu takiben deriden serbest ilaç moleküllerinin permeasyonun gerçekleştiği öne sürülmektedir

(Mekanizma A). İkinci olarak, lipozomların *stratum corneum*'da oluşturdukları yapısal değişikliklerden dolayı bir penetrasyon arttırıcı etkisi olabileceği belirtilmektedir (Mekanizma B). Bir diğer öngörü ise; deri yüzeyine yapışmasına bağlı olarak, lipozomların muhtemelen *stratum corneum*'daki lipit matrikste füzyon prensibi ile geçişlerinin gerçekleşmesidir (Mekanizma C). Ayrıca, çeşitli tartışmalara rağmen lipozomların özellikle daha esnek yapıdaki transferzomların bozunmadan deriye nüfuz ettiği yönünde bir görüş de mevcuttur (D Mekanizması) (El Maghraby ve ark. 2006; El Maghraby ve ark. 2008).

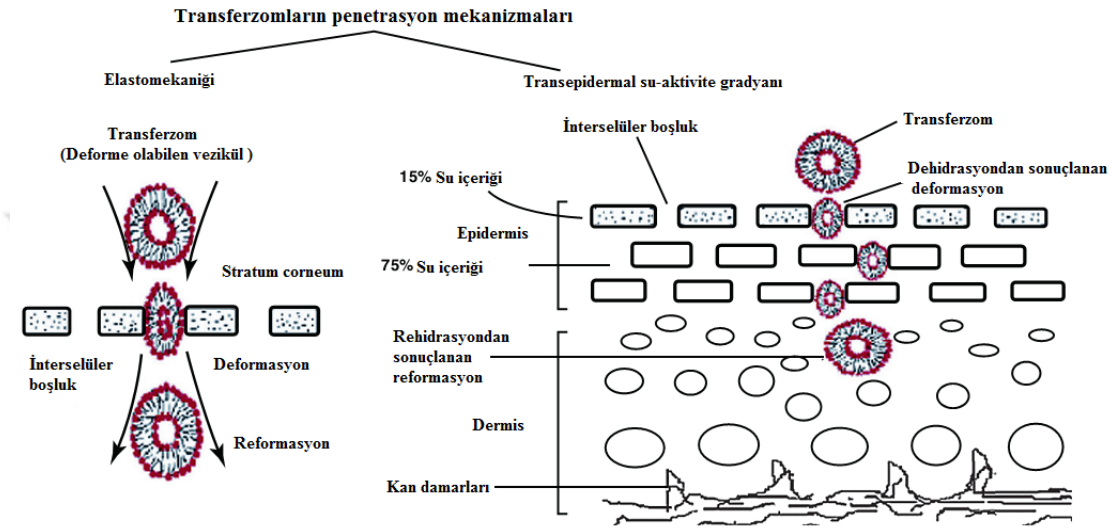
Ultradeforme olabilen lipit bazlı elastik veziküllerin ise klasik lipozomlardan daha iyi deforme olabilmeleri nedeniyle deriden geçebildiği yönünde yaklaşımlar mevcuttur. Şekil 2.13'te elastik veziküllerin deriden geçiş mekanizması gösterilmektedir (Ascenso ve ark. 2015) .



Şekil 2-13: Ultradeforme edilebilen veziküllerin deriye penetrasyon ve permeasyonuna ait şematik gösterim

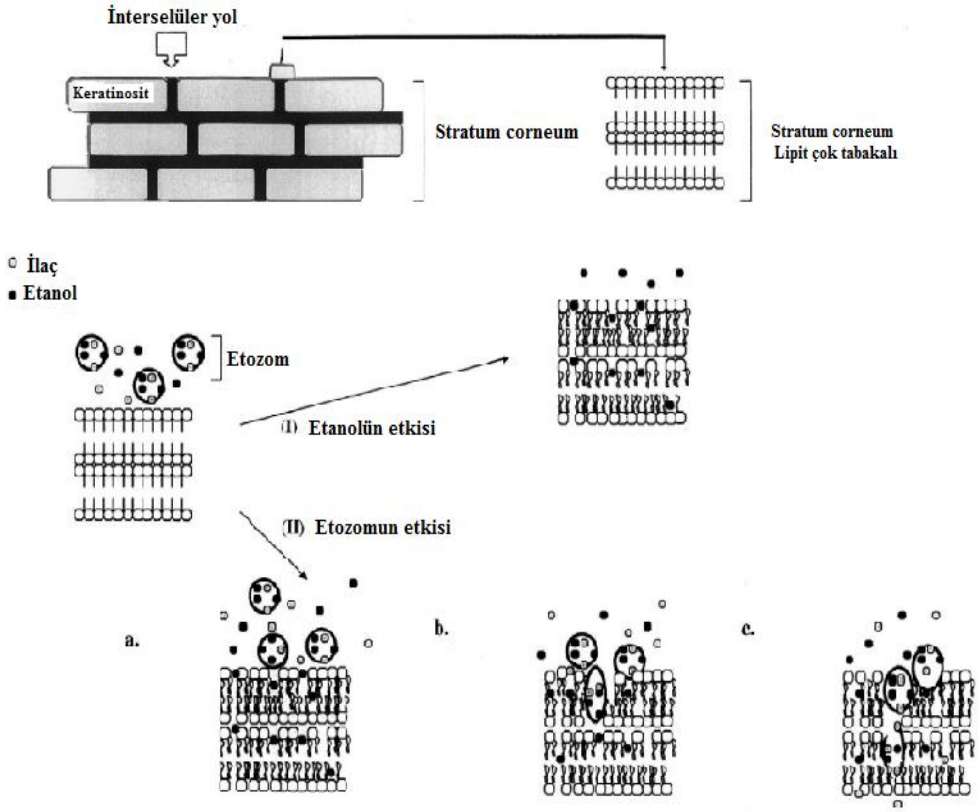
Transferzomların deriden hidrotaksis ile deriden geçtiği yaklaşımı mevcuttur. *Stratum corneum* un %15 su içeriğine sahip üst kısmında dehidratasyonla deformasyona uğrar ve yapısındaki su kaybederek boyutunun küçülmesi ile *stratum corneum*'daki hücreler arası bölgeden geçebildiği öne sürlmektedir. *Stratum corneum*'un %75 su

içeriğine sahip dah alt bölgesine geldiğinde ise veziküllerin rehidratasyonla tekrar eski boyutuna kavuştuğu varsayılmakatdır. Transferzomların deriden hücrelerarası geçişi ise transferzomun yapısındaki yüzey etken maddenin hücre membranı yapısını bozmasıyla açıklanmaktadır. Şekil 2.14 bu mekanizmaları şematik olarak göstermektedir (Kumar ve ark. 2012).



Şekil 2-14: Transferatomların (ultra deforme olabilen vezikül) deriden geçiş mekanizmaları

Etozomların deriden geçişi arttırmasına yönelik de çeşitli mekanzimalar öne sürülmektedir. Birinci yaklaşımda, bileşiminde bulunan etanolün *stratum corneum*'daki lipit çift tabakanın düzenini bozarak lipit akışkanlığını arttırdığı öne sürülmektedir. Daha sonra esnek etozom veziküllerinin yapısı bozulmuş *stratum corneum*'a nüfuz ederek deriden bir geçiş yolu oluşturabildiği de öngörülmektedir. Derinin alt tabakalarında ilacın salımı ve transdermal absorpsiyonu, etozomların deri lipitleri ile füzyonu ve penetrasyon yolu boyunca farklı noktalarda ilaç salımının sonucu olarak açıklanmaktadır. Ek olarak, etozomların foliküllerde birikim olasılığı da incelenmektedir (Touitou, Dayan ve ark. 2000). Şekil 2.15' te ise etozomal sistemlerinin deriden geçişindeki önerilen mekanizmalar gösterilmektedir (Touitou, Dayan ve ark. 2000).



Şekil 2-15: Etozomal sistemlerinin deriden geçişinde önerilen model

Transetozomların deriden geçiş mekanizmaları ise hem transferzomların hem de etozomların geçiş mekanzimalarını taşıdığı öne sürülmektedir (Song ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kullanılan Kiymyasal Maddeler

- Tazaroten (Olon, Milano, İtalya)
- Takrolimus (Bilim İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş'den temin edilmiştir)
- Fosfolipid 90 G (Soya fasulyesi fosfatidil Kolin) (Lipoid)
- Triton X100 (Sigma Aldrich)
- Tween 80 (Polietelin Glycol sorbitan monooleat) (Sigma-Aldrich)
- Span 80 (Sigma-Aldrich)
- Span 85 (Sigma-Aldrich)
- Oleik asit (Sigma-Aldrich)
- Sodyum Kolat (Sigma-Aldrich)
- O-fosforik Asit (Merck)
- Asetonitril (HPLC saflığında)(Merck)
- Metanol (HPLC saflığında)(Merck)
- Kloroform (Merck)
- 1,2-Propandiol (Propilen glikol) (Merck)
- Etanol (Merck)
- Asetik Asit (Merck)
- Sodyum Klorür (Riedel de Haen)
- Potasyum Klorür (Lachema)
- Disodyum Hidrojen fosfat Na2HPO4 (Merck)
- Potasyum Dihidrojen fosfat KH2PO4 (Merck)
- Nil Kırmızısı (Sigma-Aldrich)

- Fosfotungstik Asit (Sigma-Aldrich)
- Fare fibroblast (*BALB/3T3, clone A31)-(ATCC CCL-163TM, USA*)
- *Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 (DMEM-F12)(Wisent multicell)*
- Fetal Bovin Serumu (FBS) Gibco)
- %1 antibiyotik (100 IU/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin) (Wisent multicell)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma)
- Dimetil Sülfoksit DMSO (Merck)
- MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür) (Sigma)

3.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler

3.1.2.1. Kullanılan Aletler

- Damlacık Büyüklüğü Ölçüm Aleti (Malvern Zetasizer-Nano ZS)
- Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (Shimadzu, Model LC 10A) (Shimadzu, Model LC 20AT)
- HPLC Kolonu (Lichrospher 100 RP-18 4,6 x 150 mm, 5µm)
- HPLC Kolonu (Intersil, ODS-3 C18 4,6 x 250 mm, 5µm)
- Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi Cihazı (LC-MS, HPLC ünitesi: Agilent, TQF-MS ünitesi: Agilent 6530)
- LC-MS Kolonu: C_{18} Poroshell 3x50mm x 2,7µm EC ve guard kolon InertSustain C18 3µm 2,1x10mmx2
- Rota Evaporatör (Rota evaporator Büchi R-210)
- Ultrasonik prob (Sonics VibraCell, 20 kHz, 3 mm çap)
- Franz Difüzyon Sistemi (Perme Gear 25 mm çap, 12 mL hacim, V6A Stirrer)
- Ultrasonik Banyo (Bersonik)

- Terazi (Sartorius Analytical Balance ENTRIS v224-1S)
- Terazi (Sartariuos CPA2P Microbalance)
- Santrifüj (Hettich, D-7200, Type 2041)
- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22R)
- Orbital Çalkalayıcı (Thermo Electron Corporation, Model 420)
- Manyetik Karıştırıcı (IKA©-Werke, R15)
- pH-metre (EuTech Instruments, PC 2700)
- Distile Su Aleti (Elga, Pure Lab Flex)
- Nutche Erleni Süzme sistemi (Sartorius D-3400)
- Vorteks (IKA® Vortex Genius 3)
- Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM JEM-1011)
- ATR-FTIR (Perkin Elmer ZnSe Spectrum One)
- Konfokal Lazer Mikroskobu (Leica TCS SPE).
- Kriyotom Cihazı (Thermo)
- Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre (Epoch)

3.1.2.2. Kullanılan Malzemeler

- Zetasizer Küveti (disposible)
- Malvern Zeta Potansiyel Ölçüm Hücresi
- HPLC Vialleri ve Kapakları
- Cam Malzeme (Rotavap balonu, Beher, Cam lam, Cam şişe, Erlen, Mezür, Pipet, Balon joje, Petri kutusu vs.)
- Eppendorf (1,5 ve 2 mL)
- Domuz Derisi
- Cerrahi Makas
- 0,45µm Membran Filtre (HVHP) (Millipore)

- Yapışkan Bant (Scotch Book Tape)(3M)
- 0,45 mm Millex®-LCR (PTFE) Filtre ucu (Millipore)
- 0,20 mm Filtre ucu (PTFE) (Sartarious)
- Vivaspin 6 MW cut-off 3000 (Sartarious)
- Mikropipetler ve Mikropipet Uçları

3.1.2.3. Kullanılan Bilgisayar Programları

- Microsoft Office Word 2013
- Microsoft Office Excel 2013
- Graphpad Prism 7

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Tazarotenin Infrared (IR) Spektrumu

Tazarotenin IR spekturumu ATR-FTIR spektrometresi (Perkin Elmer Zn Spectrum One) kullanılarak alındı. Toz halde tazaroten, cihazın ATR-kristali üzerine yerleştirildi ve 100 Newton kuvvet uygulanarak 4000 ve 600 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlük ile spektrum kaydedildi.

3.2.2. Takrolimusun Infrared (IR) Spektrumu

Takrolimusun IR spekturumu ATR-FTIR spektrometresi (Perkin Elmer Zn Spectrum One) kullanılarak alındı. Toz halde takrolimus cihazın ATR-kristali üzerine yerleştirildi ve 100 Newton kuvvet uygulanarak 4000-600 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlük ile spektrum kaydedildi.

3.2.3. Tazarotenin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Miktar Tayini Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

Tazarotenin miktar tayininde kullanılmak üzere, literatürde kayıtlı bir yöntemin (Madhu ve ark. 1997) üzerinde bazı değişiklikler yapılarak HPLC miktar tayini yöntemi geliştirildi ve yöntemin geçerliliği için ICH kılavuzuna göre validasyonu yapıldı (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005).

Hareketli fazın hazırlanması: HPLC yönteminde hareketli faz olarak asetonitril/su/asetik asit (65,0/34,5/0,5, h/h/h) karışımı hazırlandı ve kullanılmadan önce

0,45µm membran filtreden (HVHP, Millipore) vakum uygulanarak süzüldü. Hareketli faz sisteme uygulanmadan önce ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek degaze edildi.

Kromatografik koşullar: Analizlerde, UV dedektörlü bir HPLC sistemi kullanıldı. Dalga boyu 345 nm'ye ayarlandı. Kromatografik ayırım için C18 HPLC kolonu (Lichrospher 100 RP-18 5 µm 4.6mm x 150mm) kullanıldı. Hareketli fazın akış hızı 1,2 ml/dk. olarak ayarlandı. Örnekler, sisteme 100 µl enjeksiyon hacminde uygulandı. Analiz süresince kolon oda sıcaklığında tutuldu. Bu koşullarda tazarotenin alıkonma süresi 15,5 dakika olarak belirlendi.

Örneklerin hazırlanması: Tazaroten standart örnekelrinin hazırlanması için, tazaroten belirlenen konsantrasyonlarda olacak şekilde asetonitrilde çözündürüldü ve bir dakika sonikatörde bekletildi. Seyreltmelerde çözücü olarak da asetonitril kullanıldı.

3.2.4. Tazarotenin Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, bir analitik yöntemin o yöntemin kullanılma hedefine uygun olduğunu kanıtlanması için yapılan işlemlerin tümünü kapsamaktadır. analitik yöntemlerin validasyonu için doğrusallık, kesinlik, doğruluk, seçicilik, stabilite, teşhis ve Miktar tayini limiti parametreleri değerlendirilmektedir (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005).

3.2.4.1. Doğrusallık

Analitik yöntemin doğrusallığı; belirlenmiş bir konsantrasyon aralığında elde edilen verilerin, analiz edilen örneklerdeki etkin maddenin miktarı ile doğru orantılı olarak değişimidir. Doğrusallığın gösterilebilmesi için, en az 5 konsantrasyon gereklidir. Genellikle, 0,9999 luk bir korelasyon katsayısı elde edilmesi, regresyon doğrusundaki verilerin kabul edilebilirliğinin göstergesi olarak kabul edilir (Shabir 2003; ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005).

Tazarotene ait analitik yönteminin doğrusallığını belirlemek için, 100 µg/ml'lik bir stok çözelti hazırlandı. Bunun için 10 mg hassas olarak tartılan tazaroten 100 ml'lik balon jojeye alındı ve üzerine çözücü olarak asetonitril ilave edilerek ultrasonik banyoda çözündürülmüş. 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05; 0,025; 0,01 µg/mL konsnatrasyonlardaki standartların hazırlanması için stok çözeltiden asetonitril ile uygun seyretmeler yapıldı. Hazırlanan standartlar, 0,45 um membran filtreden süzülerek

HPLC viallerine doldurulduu. Yöntem 3.2.3'te analtılan koşullarda analizler gerçekleştirilerek her konsantrasyona karşılık gelen eğri altında kalan alan (AUC) değerleri saptandı. Her örnek için en az üç enjeksiyon yapıldı, standart sapma (SD) ve yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerleri hesaplandı. Bu veriler kullanılarak, analizlerde kullanılan standart doğru denklemi ve korelasyon katsayısı de hesaplandı.

3.2.4.2. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliği, önceden belirlenmiş koşullarda bir testte elde edilen her sonucun tekrarlanabilmesinin veya bir testin sonuçlarının birbirine yakın olabilme derecesini göstergesidir. Gün içi ve günler arası kesinlik olarak değerlendirilir. Aynı testin gün içinde tekrarlanması ile gün içi kesinlik sonuçlarının ortalaması ile SD ve %RSD değerleri hesaplanır. Aynı testin farklı günlerde tekrarlanması ile elde edilen değerlerin ortalaması alınarak da günler arasına SD ve % RSD değerleri hesaplanır (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005).

Tazarotenin HPLC yönteminin kesinliğini göstermek için 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak 5µg/ml, 1 µg/ml ve 0,1 µg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda örnekler hazırlandı. Örnekler belirtilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek, tazarotenin miktarı saptandı. Aynı işlem üç gün tekrarlanarak, her örnek için ortalama, SD ve % RSD değerleri hesaplandı.

3.2.4.3. Doğruluk

Analitik yöntemin doğruluğu, bu yöntem ile elde edilen değerlerin gerçek değere veya şahit değere yakınlığının göstergesidir (ICH Harmonized Tripartite Guidline, 2005). Tazaroten için geliştirilen HPLC yönteminin doğruluğunu saptamak için 100 µg/ml konsantarsyondaki stok çözeltisinden gerekli seyreltmer yapılarak 5µg/ml, 1 µg/ml ve 0,1 µg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda örnekler hazırlandı. Örneklere tazaroten formülasyonlarındaki kullanılan yardımcı maddelerden en yüksek değerde olacak şekidle ilave edildi. Elde edilen piklerin alanlarından doğru denklemi kullanılarak örneklerdeki tazaroten miktarları belirlendi. Geliştirilen yöntemin doğruluğu tazarotenin ise % geri kazanma değerleri hesaplanarak saptandı.

3.2.4.4. Seçicilik

Bir analitik yöntemin seçiciliği analiz edilen etkin madde ile girişim yapabilme potansiyeli olan bütün bileşenlerden ayrılarak arklı olarak ölçüm yeteneği olarak

tanımlanır (Shabir 2003; ICH Harmonized Tripartite Guidline, 2005). Seçiciliğin saptanabilmesi için; domuz derisi, soyma işleminde kullanılan bant, tazaroten içermeyen boş formülasyonlar ve formülasyonların bileşiminde yer alan bütün yardımcı maddeleri içeren örnekler HPLC yöntemi ile analiz edilerek, yardımcı maddelerin tazaroten ile aynı alıkonma zamanında bir pik verip vermediği belirlendi.

3.2.4.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limit

Analitik yöntemin düşük konsantrasyonları saptayabilmesi ve doğru, kesin olarak miktarının belirlenebilmesinin göstergesi sırası ile Teşhis Limiti (TL, *Limit of Detection* LOD) ve Miktar Tayin Limiti (MTL, *Limit of Quantification* LOQ) olarak değerlendirilir. Örneklerdeki etkin maddenin tayin edilebilecek en az TL değerini, en düşük tayin edebilen konsantrasyonu ise MTL değerini verir (ICH Harmonized Tripartite Guidline, 2005).

Yöntemin TL ve MTL değerlerini hesaplamak için en az 3 tane kalibrasyon doğrusunun eğimleri ve kesişim noktalarının SD değerleri ve aşağıda verilen Denklemler (3.1 ve 3.2) kullanılarak hesaplandı (ICH Harmonized Tripartite Guidline, 2005).

TL= 3,3 SD/ Ort (3-1)

MTL= 10 SD/ Ort (3-2)

SD: Standart doğruların eğimlerinin standart sapmaları

Ort: Standart eğrilerin eğimlerinin ortalamaları

3.2.4.6. Örneklerin Stabilitesi

Örneklerdeki tazarotenin analiz süresince stabil kaldığını belirlemek için stabilite çalışması yapıldı. Bunun için, yöntem 3.2.3'te belirtildiği gibi çalışlarak 1 µg/ml konsantrasyonda tazaroten içeren örnekler hazırlandı ve 1., 2., 4., 6., 12., 24. ve 48. saatin sonunda HPLC cihazına enjekte edildi. Belirtilen süre bekleme süreleri sonunda sonunda örnekler ile elde edilen pik alanlar ile, hemen cihaza enjekte edilen örnekler ile elde edilen pik alanlarında fark olup olmadığı tespit edildi.

3.2.5. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Takrolimus yüklü formülasyonların enkapsülasyon verimini değerlendirmek için HPLC yöntemi kullanıldı. Takrolimusun HPLC miktar tayininde kullanmak üzere literatürde kayıtlı yöntemlerin (Shi ve ark. 2012; Seo ve ark. 2015) üzerinde bazı

değişiklikler yapılarak bir HPLC analiz yöntemi geliştirildi ve yöntemin geçerliliği için ICH kılavuzuna göre validasyonu yapıldı (ICH Harmonised Tripartite Guidline 2005).

Hareketli fazın hazırlanması: HPLC yönteminde hareketli faz olarak asetonitril/su/fosforik asit (75/25/0,2: h/h/h) karışımı hazırlandı ve kullanılmadan önce 0,45µm membran filtreden (HVHP, Millipore) vakum uygulanarak süzüldü. Hareketli faz sisteme uygulanmadan önce ultrasonik banyoda 15 dk. bekletilerek degaze edildi.

Kromatografik koşullar: Analizlerde, UV dedektörlü bir HPLC sistemi kullanıldı. Dalga boyu 210 nm'ye ayarlandı. Kromatografik ayırım için C_{18} HPLC kolonu (ODS-3 C18 5 um 4.6mm x 250mm) kullanıldı. Hareketli fazın akış hızı 1 ml/dk. olarak ayarlandı. Örnekler, siteme 50 µl enjeksiyon hacminde uygulandı. Analiz süresince kolon sıcaklığı 60 C°'ye ayarlandı. Bu koşullarda takrolimusun alıkonma süresi 10,5 dakika olarak belirlendi.

Örneklerin hazırlanması: Takrolimus standart örneklerinin hazırlanması için, takrolimus belirlenen konsantrasyonlarda olacak şekilde asetonitrilde çözündürüldü ve bir dakika sonikatörde bekletildi. Seyreltmelerde çözücü olarak da asetonitril kullanıldı.

3.2.6. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

3.2.6.1. Doğrusallık

Takrolimusa ait analitik yönteminin doğrusallığını belirlemek için, 100 µg/ml'lik bir stok çözelti hazırlandı. Bunun için 10 mg hassas olarak tartılan takrolimus 100 ml'lik balon jojeye alındı ve üzerine çözücü olarak asetonitril ilave edilerek ultrasonik banyoda çözündürüldü. 75; 50; 25; 10; 5; 1; 0,1 µg/mL µg/mL konsantrasyonlardaki standartların hazırlanması için stok çözeltiden asetonitril ile uygun seyretmeler yapıldı. Hazırlanan standartlar, 0,45 um membran filtreden süzülerek HPLC viallerine dolduruldu. Yöntem 3.2.5'te analtılan koşullarda analizler gerçekleştirilerek her konsantrasyona karşılık gelen eğri altında kalan alan (AUC) değerleri saptandı. Her örnek için en az üç enjeksiyon yapıldı, standart sapma (SD) ve yüzde bağıl standart sapma (%RSD) değerleri hesaplandı. Bu veriler kullanılarak, analizlerde kullanılan standart doğru denklemi ve korelasyon katsayısı de hesaplandı.

3.2.6.2. Kesinlik

Takrolimusun HPLC yönteminin kesinliğini göstermek için 100 µg/ml konsantrasyondaki stok çözeltisinden gerekli seyreltmeler yapılarak 50 µg/ml, 10 µg/ml

ve 1.0 µg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda örnekler hazırlandı. Örnekler belirtilen HPLC yöntemi ile analiz edilerek, takrolimusun miktarı saptandı. Aynı işlem üç gün tekrarlanarak, her örnek için ortalama, SD ve % RSD değerleri hesaplandı.

3.2.6.3. Doğruluk

Takrolimus için geliştirilen HPLC yönteminin doğruluğunu saptamak için 100 µg/ml konsantarsyondaki stok çözeltisinden gerekli seyreltmer yapılarak 50 µg/ml, 10 µg/ml ve 1.0 µg/ml olmak üzere üç farklı konsantrasyonda örnekler hazırlandı. Örneklere takrolimus formülasyonlarındaki kullanılan yardımcı maddelerden en yüksek değerde olacak şekidle ilave edildi. Elde edilen piklerin alanlarından doğru denklemi kullanılarak örneklerdeki takrolimus miktarları belirlendi. Geliştirilen yöntemin doğruluğu takrolimusun ise % geri kazanma değerleri hesaplanarak saptandı.

3.2.6.4. Seçicilik

Seçiciliğin saptanabilmesi için, takrolimus içermeyen boş formülasyonlar ve formülasyonların bileşiminde yer alan bütün yardımcı maddeleri içeren örnekler HPLC yöntemi ile analiz edilerek, yardımcı maddelerin takrolimus ile aynı alıkonma zamanında bir pik verip vermediği belirlendi.

3.2.6.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayini Limit

Takrolimusun geliştirilen HPLC yönteminin TL ve MTL değerleri yöntem 3.2.4.5'da anlatıldığı gibi çalışılarak saptandı.

3.2.6.6. Örneklerin Stabilitesi

Örneklerdeki takrolimusun analiz süresince stabilitesini belirlemek için stabilite çalışması yapıldı. Bunun için, yöntem 3.2.6'da belirtildiği gibi çalışılarak 10 µg/ml konsantrasyonda takrolimus içeren örnekler hazırlandı ve 1., 2., 4., 6., 12., 24. ve 48. saatin sonunda HPLC cihazına enjekte edildi. Belirtilen süre bekleme süreleri sonunda örnekler ile elde edilen pik alanlar ile, hemen cihaza enjekte edilen örnekler ile elde edilen pik alanlarında fark olup olmadığı tespit edildi.

3.2.7. Takrolimusun LC-MS Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

İn vitro deriden penetrasyon çalışmasındaki örneklerdeki takrolimus miktaralarının, geliştirilen HPLC yönteminin MTL değereinin altında olması nedeniyle, deride lokalize olan takrolimus miktarının saptanması için daha hassas bir analitik

yöntem olarak sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS) ile çalışıldı. İn vitro deriden penetrasyon çalışmasındaki numuneler gaz fazında iyonlaştırılarak molekülün kütle/yük oranı (m/z) ölçülerel yüksek hassasiyette analizler gerçekleştirildi. *İn vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında deride lokalize olan takrolimus miktarının Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) yöntemi literatürdeki yönteme değişiklikler yapılarak kullanıldı (Goebel ve ark. 2011).

Hareketli fazın hazırlanması: LC-MS yönteminde hareketli faz olarak asetonitril/su/fosforik asit (65/35/0,005: h/h/h) karışımı hazırlandı ve kullanılmadan önce 0,45µm membran filtreden (HVHP, Millipore) vakum uygulanarak süzüldü. Hareketli faz sisteme uygulanmadan önce ultrasonik banyoda 15 dakika bekletilerek degaze edildi.

Kromatografik koşullar: Analizlerde, Agilent 6530 LC-MS sistemi kullanıldı. Dual elektrospray ESI kaynağı dedektör olarak kullanıldı. Kromatografik ayırım için C_{18} HPLC kolonu (Poroshell 3x50mm x 2,7µm EC) ve guard kolon (InertSustain C18 3µm 2,1x10mmx2) kullanıldı. Hareketli fazın akış hızı 0,2 ml/dk. olarak ayarlandı. Örnekler, siteme 10 µl enjeksiyon hacminde uygulandı. Analiz süresince kolon sıcaklığı 60 C°'ye ayarlandı. Bu koşullarda takrolimusun alıkonma süresi 7 dakika olarak belirlendi.

Örneklerin hazırlanması: Takrolimus standart örneklerinin hazırlanması için, takrolimus belirlenen konsantrasyonlarda olacak şekilde asetonitrilde çözündürüldü ve bir dakika sonikatörde bekletildi. Seyreltmelerde çözücü olarak da asetonitril kullanıldı. 5000 ng/ml bir stok çözeltisi hazırlamak için 1,25 mg takrolimus hassas tartıldı ve 250 ml'lik balon jojede asetonitril ile ultrasonik banyoda bekletirlerek çözündürüldü, Stok çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 2500; 1000; 500; 250; 100; 50; 25; 10; 5 ng/mL konsantrasyon aralığında örnekler hazırlandı. Hazırlanan standartlar, membran filtreden (0,45 µm PTFE, Millipore) süzülerek HPLC viallerine dolduruldu. Yöntem 3.2.7.'de anlatıldığı gibi çalışılarak LC-MS yöntemi ile analiz edildi. Her örnek için verilen yanıt (toplam iyon kromatogramında her saniyede yapılan sayım) kaydedildi. Her konsantrasyona karşılık gelen toplam iyion kromatogramı ile yönteme ait standart doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı hesaplandı.

3.2.8. Transetozom Tipi Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Optimizasyon Çalışmaları

Tazaroten ve takrolimus etkin maddelerinin transetozom tipi veziküler taşıyıcı sistemlerinin bileşenlerinin belirlenmesi için formülasyon optimizasyon çalışmaları yürütüldü. Formülasyon geliştirme çalışmalarında tazaroten ve takrolimus yüklü veziküllerin bileşiminde kullanılan, fosfolipit, kenar aktivatörleri (sürfaktanlar), diğer yardımcı maddeler ile etanol oranları sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3-1: Tazaroten yüklü transetozomların bileşenleri

Formülasyonda Kullanılan Maddeler	**Kullanma Oranı**
Tazaroten	**% 0,05 - 0,1 (a/h)**
Fosfolipit Phosphlipon 90 G (Soya fasulyesi Fosfatidil-kolini)	**% 3 - 6 (a/h)**
Kenar Aktivatörü veya yardımcı madde Tween 80 Sodyum Kolat Span 80 Span 85	**% 0,5 - 1,33 (a/h)**
Penetrasyon arttırıcı Oleik asit	**% 1 (a/h)**
Etanol	**% 10 - 40 (h/h)**

Tablo 3-2: Takrolimus yüklü transetozomların bileşenleri

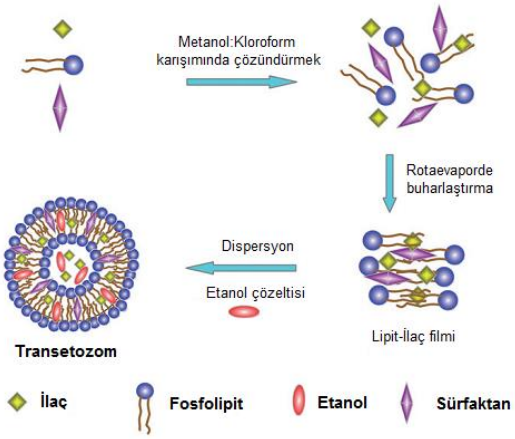
Formülasyonda Kullanılan Maddeler	**Kullanma Oranı**
Takrolimus	**% 0,1 (a/h)**
Fosfolipit Phosphlipon 90 G (Soya fasulyesi Fosfatidil-kolini)	**% 2 - 6 (a/h)**
Kenar Aktivatörü veya yardımcı madde Tween 80 Sodyum Kolat Span 80 Span 85	**75:25, 80:20, 85:15, 90:10 (Fosfolipit:Kenar Aktivatörü) (a:a)***
Penetrasyon artırıcı madde Oleik asit	**% 1 (a/h)**
Etanol	**% 10 – 40 (h/h)**

*Takrolimus yüklü transetozomların formülasyonlarıda kulanılan kenar aktivatörü maddeler bileşiminde kullanılan fosfolipit oranına (a:a) göre hazırlanmıştır.

Transetozomlar “konvansiyonel ince film hidrasyon” yöntemi ile (Verma ve ark. 2003; Montanari ve ark. 2007; Song ve ark. 2012) ile hazırlandı. Tazaroten yüklü transetozomların formülasyon optimizasyonu çalışmaları kapsamında, transetozom formülasyonlarına tazaroten %0,05 ve 0,1 oranlarında olacak şekilde yüklendi.

Transetozomların hazırlanması için; fosfolipit (Phospholipon 90G, P90G) ve kenar aktivatörü olarak bir yüzey etken madde veya penetrasyon arttıtırıcı kloroform:metanol (1:1, h/h) karışımında çözündürüldü. Etkin maddeler (tazaroten veya takrolimus) de fosfolipit ve kenar aktivatörü ile birlikte organik çözücü karışımında çözündürüldü. Sistemdeki organik çözücü karışımı lipit geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta (40°C’de) bir rotaevaporatör (Büchi R-210, Büchi Labortechnik, Switzerland) kullanılarak ve 180 rpm’de dönüş hızı ile ince bir lipit film tabakası bırakacak şekilde uzaklaştırıldı. Organik çözücü artıklarının tamamen uzaklaştırılması için, balon içindeki oluşturulan ince film bir gece vakum altında bekletildi, daha sonra bu kuru lipit film, farklı konsantrasyonlardaki etanol:su karışımı ile hidrate edildi. Elde edilen transetozomal süspansiyon oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek oluşan veziküllerin şişmeleri sağlandı. Bir sonraki adımda ise, bir ultrasonik prob (Sonics VibraCell, 20 kHz, 3 mm çap) ile 4 °C de 5 dakika sonikasyon işlemi uygulanarak transetozom süspansiyonunun homojen olması sağlandı ve nano boyutta veziküller elde edildi.

Transetozomların hazırlama yöntemi şematik olarak Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3-1: Transetozomların hazılanmasına ait şematik gösterim

3.2.8.1. Tazaroten Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Optimizasyonu

Tazaroten yüklü transetozomların optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonlar, transetozomların bileşiminde kullanılan kenar aktivatörü (yüzey etken madde) veya penetrasyon arttırıcı maddeye göre sınflandırıldı. Tazaroten transetozom formülasyonlarına %0,05 oranında yüklendi. Tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşenleri Tablo 3.3, Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3-3: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon Kodu	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TZ 4-TW 1-10	4	Tween 80: 1	%10 Etanol / Su
TZ 4-TW 1-20	4	Tween 80: 1	%20 Etanol / Su
TZ 4-TW 1	4	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TZ 4-TW 0,66-20	4	Tween 80: 0,66	%20 Etanol / Su
TZ 4-TW 1-40	4	Tween 80: 1	%40 Etanol / Su
TZ 4-TW 0,5	4	Tween 80: 0,5	%30 Etanol / Su
TZ 4-TW 1,33	4	Tween 80: 1,33	%30 Etanol / Su
TZ 3-TW 1	3	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TZ 3-TW 0,53	3	Tween 80: 0,53	%30 Etanol / Su
TZ 5-TW 1	5	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TZ 6-TW 1	6	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su

Tablo 3-4: Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon Kodu	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TZ 4-SK 1-20	4	Sodyum kolat: 1	%20 Etanol / Su
TZ 4-SK 1	4	Sodyum kolat: 1	%30 Etanol / Su
TZ 4-SK 0,66	4	Sodyum kolat: 0,66	%30 Etanol / Su
TZ 3-SK 0,53	3	Sodyum kolat: 0,53	%30 Etanol / Su
TZ 5-SK 1	5	Sodyum kolat: 1	%30 Etanol / Su
TZ 5-SK 0,55	5	Sodyum kolat: 0,55	%30 Etanol / Su
TZ 6-SK 1	6	Sodyum kolat: 1	%30 Etanol / Su
TZ 6-SK 0,66	6	Sodyum kolat: 0,66	%30 Etanol / Su

Tablo 3-5: Kenar aktivatörü olarak Span 80 ve Span 85, penetrasyon artırıcı olarak oleik asit kullanılarak hazırlanan diğer tazaroten yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon Kodu	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TZ 4-SP 1	4	Span 80: 1	%30 Etanol / Su
TZ 4-SP85 1	4	Span 85: 1	%30 Etanol / Su
TZ 4-OL 1	4	Oleik asit: 1	%30 Etanol / Su

Tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonların nano-veziküler bir sistem oluşturup oluşturmadığı, görsel olarak ve vezikül boyutu dağılımı incelenerek değerlendirildi. Uygun olan transetozomlar karakterizasyon çalışmaları yapılmak üzere seçildi.

3.2.8.2. Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Optimizasyonu

Takrolimus yüklü transetozomların optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonlar, bileşiminde kullanılan fosfolipit konsantrasyonuna ve kenar aktivatörüne (yüzey etken madde) veya penetrasyon arttırıcıya göre sınıflandırıldı. Takrolimus transetozom formülasyonlarına takrolimus % 0,1 oranlarında olacak şekilde yüklendi. Takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının kodları ile bileşenleri Tablo 3.6 ile Tablo 3.15'te verilmiştir.

Tablo 3-6: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon Kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 6-TW 2	(75:25)	6	Tween 80: 2	%30 Etanol / Su
TC 6-TW 1,5	(80:20)	6	Tween 80: 1,5	%30 Etanol / Su
TC 6-TW 1,058	(85:15)	6	Tween 80: 1,058	%30 Etanol / Su
TC 6-TW 0,66	(90:10)	6	Tween 80: 0,66	%30 Etanol / Su

Tablo 3-7: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon Kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 5-TW 1,66	(75:25)	5	Tween 80: 1,66	%30 Etanol / Su
TC 5-TW 1,25	(80:20)	5	Tween 80: 1,25	%30 Etanol / Su
TC 5-TW 0,88	(85:15)	5	Tween 80: 0,88	%30 Etanol / Su
TC 5-TW 0,555	(90:10)	5	Tween 80: 0,555	%30 Etanol / Su

Tablo 3-8: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon Kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 4-TW 1,33	(75:25)	4	Tween 80: 1,33	%30 Etanol / Su
TC 4-TW 1	(80:20)	4	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TC 4-TW 0,705	(85:15)	4	Tween 80: 0,705	%30 Etanol / Su
TC 4-TW 0,444	(90:10)	4	Tween 80: 0,444	%30 Etanol / Su
TC 4-TW 1-10	(80:20)	4	Tween 80: 1	%10 Etanol / Su
TC 4-TW 1-20	(80:20)	4	Tween 80: 1	%20 Etanol / Su
TC 4-TW 1-40	(80:20)	4	Tween 80: 1	%40 Etanol / Su

Tablo 3-9: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 3-TW 1	(75:25)	3	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TC 3-TW 0,75	(80:20)	3	Tween 80: 0,75	%30 Etanol / Su
TC 3-TW 0,529	(85:15)	3	Tween 80: 0,529	%30 Etanol / Su
TC 3-TW 0,333	(90:10)	3	Tween 80: 0,333	%30 Etanol / Su

Tablo 3-10: %2 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 2-TW 0,66	(75:25)	2	Tween 80: 0,66	%30 Etanol / Su
TC 2-TW 0,5	(80:20)	2	Tween 80: 0,5	%30 Etanol / Su
TC 2-TW 0,353	(85:15)	2	Tween 80: 0,353	%30 Etanol / Su
TC 2-TW 0,222	(90:10)	2	Tween 80: 0,222	%30 Etanol / Su

Tablo 3-11: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Sktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 6-SK 2	(75:25)	6	Sodyum Kolat : 2	%30 Etanol / Su
TC 6-SK 1,5	(80:20)	6	Sodyum Kolat: 1,5	%30 Etanol / Su
TC 6-SK 1,058	(85:15)	6	Sodyum Kolat:1,058	%30 Etanol / Su
TC 6-SK 0,666	(90:10)	6	Sodyum Kolat: 0,666	%30 Etanol / Su

Tablo 3-12: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 5-SK 1,66	(75:25)	5	Sodyum Kolat:1,66	%30 Etanol / Su
TC 5-SK 1,25	(80:20)	5	Sodyum Kolat:1,25	%30 Etanol / Su
TC 5-SK 0,88	(85:15)	5	Sodyum Kolat:0,88	%30 Etanol / Su
TC 5-SK 0,555	(90:10)	5	Sodyum Kolat: 0,555	%30 Etanol / Su

Tablo 3-13: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 4-SK 1,33	(75:25)	4	Sodyum Kolat: 1,33	%30 Etanol / Su
TC 4-SK 1	(80:20)	4	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su
TC 4-SK 0,705	(85:15)	4	Sodyum Kolat: 0,705	%30 Etanol / Su
TC 4-SK 0,444	(90:10)	4	Sodyum Kolat: 0,444	%30 Etanol / Su
TC 4-SK 1-40	(80:20)	4	Sodyum Kolat: 1	%40 Etanol / Su

Tablo 3-14: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 3-SK 1	(75:25)	3	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su
TC 3-SK 0,75	(80:20)	3	Sodyum Kolat: 0,75	%30 Etanol / Su
TC 3-SK 0,529	(85:15)	3	Sodyum Kolat: 0,529	%30 Etanol / Su
TC 3-SK 0,333	(90:10)	3	Sodyum Kolat: 0,333	%30 Etanol / Su

Tablo 3-15: %4 fosfolipit ve ve diğer kenar aktivatörü tipi veya penetrasyon arttırıcı kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 4-SP85 1	(80:20)	4	Span 85: 1	%30 Etanol / Su
TC 4-SP 1	(80:20)	4	Span 80: 1	%30 Etanol / Su
TC 4-OL 1	(80:20)	4	Oleik Asit: 1	%30 Etanol / Su

Takrolimus yüklü transetozom formülasyonların formülasyon optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonların nano-veziküler bir sistem oluşturup oluşturmadığı görsel ve vezikül boyutu dağılımı incelenerek değerlendirildi. Uygun olan transetozom formülasyonlar karakterizasyon çalışmaları yapılmak üzere seçildi.

3.2.9. Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Tipi Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının deriye penetrasyon çalışmalarında etkinliğini karşılaştırmak amacı ile kontrol formülasyonu olarak tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom tipi veziküler taşıyıcı sistemleri Yöntem 3.2.8'de anlatıldığı gibi çalışılarak "ince film hidrasyon yöntemi" kullanılarak hazırlandı.

Tazaroten yüklü transferzom formülasyonu etanol ilave edilmeden, kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlandı. Takrolimus yüklü transferzom formülasyonu ise etanol ilave edilmeden, kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlandı.

Tazaroten ve takrolimus yüklü etozom formülasyonları kenar aktivatörü ilave edilmeden, %30 etanol içerecek şekilde hazırlandı.

Kontrol amaçlı kullanılmak üzere hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarının bileşenleri Tablo 3.16'de verilmiştir.

Tablo 3-16: Tazaroten ve takrolimus yüklü kontrol amaçlı hazırlanan transferzom ve etozom formülasyonları

Formülasyon	Kod	Etkin madde (%)	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
Tazaroten yüklü transferzom	TZ-TR	0,05	4	Tween 80: 1	% 100 Su
Tazaroten yüklü etozom	TZ-ET	0,05	4	-	%30 Etanol/Su
Takrolimus yüklü transferzom	TC-TR	0,1	4	Sodyum Kolat: 1	% 100 Su
Takrolimus yüklü etozom	TC-ET	0,1	4	-	%30 Etanol/Su

3.2.10. Tazarotenin Propilen Glikoldeki Doymuş Çözeltisi ile Tazaroten ve Takrolimusun Hidroetanolik Doymuş Çözeltilerinin Hazırlanması

Tazaroten yüklü transetozomların deriden penetrasyonunun karşılaştırılmasında kontrol olarak kullanılmak üzere tazarotenin propilen glikoldeki doymuş çözeltisi hazırlandı.

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının deriye penetrasyon çalışmalarında kontrol olarak kullanılmak üzere her iki etkin maddenin %30'luk hidroetanolik çözücüdeki doymuş çözeltisi de hazırlandı.

Hazırlanan bu çözeltilerde etkin maddelerin çözünürlükleri hesaplandı. Bu amaçla, tazaroten ve takolimusun aşırı miktarı ayrı ayrı %30 etanol/su (h/h) karışımına eklenerek 25°C'de orbital çalkalayıcıda 24 saat süre ile karıştırıldı. Süre sonunda örnekler 15000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çözünmeyen etkin maddelerin çökmesi sağlandı ve üstte kalan kısım membran filtreden (PTFE, Millipore 0,45µm) süzüldü. Örnekler gerektiğinde seyreltilerek HPLC miktar tayini yöntemi ile analiz edildi ve her iki etkin maddenin %30 etanol-su karışımındaki çözünürlüğü hesaplandı.

Tazarotenin propilen glikoldeki doymuş çözeltisi de aynı şekilde çalışılarak hazırlandı ve tazarotenin propilen glikoldeki çözünürlüğü hesaplandı. Bütün örneklerin analizi için çalışma 3 kez tekrarlandı.

3.2.11. Optimize Edilen Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonlarının Vezikül Boyutu ve Dağılımı ile Fiziksel Stabilite Çalışmaları

3.2.11.1. Vezikül Boyutu ve Polidispersite İndeksinin Değerlendirilmesi

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımını değerlendirmek için ölçümlerde Dinamik Işık Saçılımı (DLS) esasına dayalı Zetasizer (Malvern Zetasizer-Nano ZS, Worcestershire, UK) cihazı kullanıldı.

Ölçümler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Hava kabarcıkların olmamasına dikkat edildi ve tek kullanımlık polistiren küvetler kullanıldı. Veziküller ilaç taıyıcı sistemleri seyreltilmeden, her formülasyon için en az üç ölçüm yapıldı. Sonuçlar ortalama vezikül boyutu ve standart sapma (±SD) değerleri olarak verildi.

3.2.11.2. Fiziksel Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının fiziksel stabilitesi buzdolabında (5°C ± 3°C) saklanarak 3 hafta süre ile izlendi. Formülasyonların 1., 2., 3. hafta sonunda vezikül boyutu ve dağılımı ölçülerek fiziksel kararlılıkları değerlendirildi.

Takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının fiziksel stabilitesi de buzdolabında (5°C ± 3°C) saklanarak 4 ay süre ile izlendi. Formülasyonlarının 1., 2., 3., 4. ay sonunda vezikül boyutu ve dağılımı ölçülerek fiziksel kararlılıkları değerlendirildi.

Her iki etken madde ile yüklü hazırlanan transetozom formülasyonları oda sıcaklığında (25°C±2°C, %60±5 RH) saklanarak, fiziksel stabiliteleri de değerlendirildi.

Hazırlanan formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı ile fiziksel stabilite bulguları değerlendirilerek daha sonraki yapılacak karakterizasyon çalışmaları için tazaroten yüklü transetozom formülasyonları seçildi.

Takrolimus yüklü transetozom formülasyonları ise; vezikül boyutu ve dağılımları ile fiziksel stabilite bulguları yanında, formülasyon bileşenleri (toplam lipit konsantrasyonu, fosfolipit: kenar aktivatörü oranı, kenar aktivatörün tipi, etanol:su karışım oranları gibi) açısısından değerlendirilerek daha sonraki karakterizasyon çalışmaları için takrolimus yüklü transetozom formülasyonları seçildi.

3.2.12. Kontrol Olarak Hazırlanan Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Formülasyonlarının Vezikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Fiziksel Stabilitleri Değerlendirilmesi

Kontrol amaçlı kullanılmak üzere hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarının Yöntem 3.2.11.1 ve Yöntem 3.2.11.2 anlatıldığı şekilde çalışılarak vezikül boyutu, polidispersite indeksi ve fiziksel stabiliteleri de değerlendirildi.

3.2.13. Seçilen Transetozom Formülasyonları ile Transferzom ve Etozom Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Seçilen tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonları üzerinde diğer karakterizasyon çalışmaları (zeta potensiyel, enkapsülasyon etkinliği, morfolojik özellik) yapıldı.

Ayrıca, kontrol amaçlı kullanılmak üzere hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarının zeta potensiyel, etkin maddelerin enkapsülasyon verimi ölçümleri de yapıldı.

3.2.13.1. Zeta Potansiyelin Ölçülmesi

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomlar ile transferzom ve etozomların zeta potansiyel değerlerinin ölçümünde elektrofonetik ışık dağılımı yöntemi (Malvern Zetasizer, Malvern) kullanıldı. Veziküller ilaç taşıyıcı sistemleri seyreltilmeden, her formülasyon için en az üç ölçüm yapıldı. Sonuçlar ortalama zeta potansiyel ve standart sapma (±SD) değerleri olarak verildi.

3.2.13.2. Enkapsülasyon Veriminin Hesaplanması

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomlar ile transferzom ve etozom formülasyonlarındaki tazaroten ve takrolimusun enkapsülasyon verimi geri kazanma ve ultrafiltrasyon yöntemleri ile hesaplandı.

Geri kazanma yöntemi: Transetozom, transferzom ve etozom formülasyonlarına yüklenen etkin madde miktarının saptanması için ilk olarak, süspansiyondaki çözünmemiş etkin madde 0,2 µm membran filtreden süzülerek uzaklaştırıldı. Ardından tazaroten yüklü formülasyonlar %20 Triton-X sulu çözeltisi ile, takrolimus yüklü formülasyonlar ise metanol ile parçalandı (Song ve ark. 2012; Grag ve ark. 2017) ve elde edilen karışımlar membran filtreden (PTFE, Millipore 0,45 µm) süzüldü. Süzüntüde bulunan tazaroten ve takrolimus miktarları yöntem 3.2.3 ve 3.2.5'de belirtilen her iki etkin maddenin HPLC miktar tayini yöntemleri ile analiz edilerek hesaplandı.

Veziküler formülasyonlara yüklenen tazaroten ve takrolimusun enkapsülasyon veriminin hesaplanması için Denklem 3.3 kullanıldı (Song ve ark. 2012):

Denklem 3.3: % Enkapsülasyon Verimi = (Ft/Fb)x100 (3-3)

Ft= Transetozom, transferzom ve etozoma yüklenen etkin madde miktarı.

Fb= Başlangıçta kullanılan etkin madde miktarı.

Ultrafiltrasyon yöntemi: Transetozom formülasyonlarına yüklenmeyen etkin maddelerin (tazaroten ve takrolimusun) veziküllerden ayrılması için filtre içeren tüpler

(Sartorius Vivaspin, MW cut-off 3000, Sartorius) kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi uygulandı (Bal ve ark. 2011; Li ve ark. 2012; Zhang ve ark. 2012). Formülasyonlara yüklenmeyen etkin maddelerin ayrılması için örnekler 4°C'de ve 8000 rpm hız ile 30 dakika santrifüj yapıldı. Her formülasyon için çalışma üç kere tekrarlandı. Transetozomlara, transferzomlara ve etozomlara yüklenmeyen etkin maddelerin miktarı da yöntem 3.2.3 ve 3.2.5'de belirtilen valide edilmiş HPLC miktar tayini yöntemleri ile analiz edilerek hesaplandı.

Veziküler formülasyonlara yüklenen tazaroten ve takrolimusun enkapsülasyon veriminin hesaplanması için Denklem 3.4 kullanıldı (Zhang ve ark. 2012):

% Enkapsülasyon Verimi = (Fb-Fu/Fb)x100 (3-4)

Ft= Transetozom, transferzom ve etozoma yüklenmeyen etkin maddenin miktarı
Fb=Başlangıçtaki etkin madde miktarı

3.2.13.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Transetozomların şekil ve yüzey morfolojilerinin görüntülenmesi için transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizi yapıldı. Görüntüleme transetozomların negatif boyanmasının ardından yapıldı. Formvar kaplı bakır gridlerin (200 mesh) üzerine seyreltilmiş transetzomdan 10 µl aktarıldı ve 10 dakika bekletikten sonra filtre kağıdı ile sıvının aşırı miktarı uzaklaştırıldı. Ardından, %2'lik fosfotungustik asit çözeltisinden 10 µl ilave edilerek, 1 dakika bekletildi ve gridler kurulduktan sonra TEM mikroskobu ile 80 kV voltajda örnekler incelendi (Ascenso ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Garg ve ark. 2017).

TEM analizleri seçilen tazarotenin TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonu (ilaç yüklemeden) ve takrolimusun TC 4-SK 1 kodlu transetozom fomülasyonu (ilaç yüklemden) üzerinde yapıldı.

3.2.14. Tazaroten ve Takrolimusun *In vitro* Koşullarda Deriye Penetrasyonlarının Bantla Soyma Yöntemi ile İncelenmesi

Karakterizasyon çalışmaları yapılan tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarından her iki etkin maddenin *in vitro* koşullarda deriye penetrasyonu bantla soyma tekniği ile deri tabakalarındaki lokalizasyonları kantitatif olarak değerlendirildi.

3.2.14.1. Deri Örneklerinin Hazırlanması

Penetrasyon çalışmalarında yerel bir kesim evinden temin edilen tam kalınlıkta domuz derisi kullanıldı (deri bir kesim evinden temin edildığı için etik kurul başvurusu yapılması gerekmemiştir). Domuz derisi öncelikle soğuk su ile yıkandı, ardından sırt (dorsal) bölgesine ait deri parçaları ayrıldı. Derinin subkütan yağ tabakası temizlendikten sonra bir cerrahi makas yardımı ile derideki kıllar *stratum corneum* tabakasına zarar vermeyecek şekidle kesildi. Bu deri parçaları kullanılana kadar -20 ºC de en fazla iki ay süre ile saklandı.

3.2.14.2. *İn vitro* Penetrasyon Çalışması

Penetrasyon çalışmalarında 14 mL reseptör hacmine ve 4,91 cm^2 difüzyon alanına sahip Franz difüzyon hücreleri (PermeGear, Hellertown, ABD) kullanıldı. Difüzyon hücrelerinin boyutuna uygun olarak dairesel kesilmiş ve Yöntem 3.2.14.1'de belirtildiği şekilde önceden hazırlanmış deri parçaları ilk olarak pH 7,4 izotonik hale getirilmiş fosfat tamponu (PBS) çözeltisi ile 30 dakika hidrate edildi. Daha sonra deri parçaları sirkülasyonlu bir su banyosu ile 37°C'ye getirilmiş Franz difüzyon hücrelerinin reseptör fazına yerleştirildi.

Reseptör faz olarak, tazaroten yüklü formülasyonların penetrasyon çalışmalarında, etanol: pH 7,4 PBS (30:70) karışımı (Patel ve ark. 2015); takrolimus yüklü formülasyonlarınkinde ise %1 sığır serum albumini (BSA) içeren pH 7.4 PBS (Lapteva, Mondon ve ark. 2014) kullanıldı. Sistemde hava kabarcığı oluşmasını engellemek için reseptör faz çözeltisi 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra hücrelere yerleştirildi ve her hücreye karıştırılması için bir magnet kondu. Reseptör faza 500 rpm karıştırma hızı uygulandı. Deri parçaları hücrelere yerleştirirken iki yüzey arasında hava boşluğu olmamasına dikkat edildi. Hücrelerin etrafındaki fazla deri parçaları cerrahi makkas ile kesildi. Hücrelerin donör fazına etkin madde yüklü 2 ml formülasyon yerleştirildi, penetrasyon çalışmasına 24 saat devam edildi. Her formülasyon için en az 3 difüzyon hücresi ile çalışıldı.

3.2.14.3. Bantla Soyma İşlemi

24 saat sonunda reseptör fazdan örnek alındıktan sonra deri parçaları Franz difüzyon hücrelerinden çıkartılarak deri yüzeyinde kalan formülasyonun fazlalığı nemli

bir kağıt havlu ile silinerek uzaklaştırıldı. Etkin maddelerin deriye penetrasyonunun incelenmesi amacı ile bant ile soyma yöntemi (Escobar-Chávez ve ark. 2008; Lademann ve ark. 2009) kullanıldı. Bu amaçla, yüzeyi formülasyondan temizlenen deri parçaları, *stratum corneum* SC tabakası üstte kalacak şekilde bir köpük levha üzerinde iğnelerle sabitlendi. Soyma işlemi, formülasyonla temas eden deri yüzeyi üzerine 3,8x4 cm olarak kesilerek hazırlanan yapışkan bantın (Scotch Book Tape, 3M) temas ettirilmesi ve belirli bir basınç uygulanması ardından çekilerek, 20 kez ardışık olarak *stratum corneum* tabakasının ayrılması şeklinde yapıldı.

3.2.14.4. Ekstraksiyon İşlemi ve Derinin Tabakalarındaki Etkin Maddelerin Miktar Tayini

Soyma işlemi tamamlandıktan sonra soyma işlemi yapılan her beş bant bir tüpe olmak üzere dört tüpe konuldu ve üzerlerine 10 ml asetonitril (Lapteva, Mondon ve ark. 2014; Yu ve ark. 2015) ilave edildi. Kalan deri (canlı epidermis+dermis) çok küçük parçalara kesilip ayrı bir tüpe alındı ve üzerine 5 ml asetonitril ilave edildi. Bantların ve kalan derinin bulunduğu tüpler 1 dakika vortekslendikten sonra bir gece boyunca oda sıcaklığında bir yatay çalkalayıcıda (IKA Shaker) 275 rpm de çalkalanarak, etkin maddenin ekstraksiyonu yapıldı.

Ekstraksiyon işlemi sonunda: tazaroten yüklü formülasyonlar için bant içeren her iki tüpün ekstraksiyon sıvısı bir araya getirildi (her 10 bant) ve 2'şer dakika vortekslendi. Hazırlanan bütün örnekler 0.45 µm filtreden süzülerek Yöntem 3.2.3'de belirtilen HPLC miktar tayini yöntemi ile analiz edildi.

Takrolimus yüklü formülasyonlar için ise bütün bantların bulunduğu 4 ayrı tüp ile ekstrakte edilen çözeltiler bir araya getirilerek (20 bant) 2'şer dakika vortekslendi. Hazırlanan bütün örnekler 0.45 µm filtreden süzülerek Yöntem 3.2.7'de belirtilen LC-MS miktar tayini yöntemi ile analiz edildi.

3.2.14.5. Kontrol Formülasyonları ile Yapılan Çalışmalar

Tazaroten yüklü transetozomlardan etkin maddenin deriye penetrasyonunun karşılaştırılması için, Yöntem 3.2.10'de anlatıldığı gibi hazırlanan tazarotenin propilen glikoldeki doymuş çözeltisi kullanıldı. Bu çözeltiden donör faza 2 ml yerleştirildi.

Takrolimus yüklü transetozomların deriye penetrasyonunun karşılaştırılması için takrolimusun Türkiye pazarındaki topikal merhem preparatı (Protopic® % 0,1 Takrolimus) kullanıldı. Merhem preparatından 2 g donör faza yerleştirildi.

Optimize edilen transetozom formülasyonlarından etkin madddelerin deriye penetrasyon etkinliğini değerlendirmek için, her iki etkin maddenin Yöntem 3.2.10'de anlatıldığı gibi hazırlanan %30'luk hidroetanolik doymuş çözeltisi de kullanıldı. Bu çözeltiden donör faza 2 ml yerleştirildi.

Tazaroten ve takrolimusun deride en yüksek birikimini sağlayan transetozom formülasyonlarının bileşenlerinden hareketle Yöntem 3.2.9'de anlatıldığı gibi hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonları da deriden geçiş çalışmalarında kontrol olarak kullanıldı. Bu formülasyonlardan da donör faza 2 ml yerleştirildi.

Kontrol amaçlı hazırlanan bütün çözelti, ticari ürün ve diğer veziküler taşıyıcı sistemlerden tazaroten ve takrolimusun *in vitro* deriden geçişi Yöntem 3.2.14'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi ve aynı şekilde bantla soyma işlemleri sonrası, her iki etkin maddenin derideki lokalizasyonları kantitatif olarak değerlendirildi.

3.2.15. ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance Infrared) Spektroskopisi Analizi

ATR-FTIR spektroskopisi analizleri deriye uygulan formülasyonların bileşimindeki maddelerin derinin *startum corneum* tabakasında meydana getirdiği yapısal farklılıkları saptamak amacı ile yapılmaktadır (Tanojo ve ark 1997, Mendelsohn ve ark. 2006).

Çalışmamızda ATR-FTIR analizleri *in vitro* deriden penetrasyon çalışması sonrası Franz difüzyon hücrelerinden çıkartılan deri örnekleri üzerinde yapıldı. Deri yüzeyindeki formülasyon fazlası yüzeyden uzaklaştırıldıktan sonra vakum altında 12 saat kurutularak, formülasyon ve reseptör fazdan kalabilecek artıkların tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Deri örnekleri, elmas-ZnSe ATR kristaline sahip Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR spektrometre tablasına, *stratum corneum* yüzeyi kristal ile temas edecek şekilde yerleştirildi. 4000-650 cm^{-1} aralığında kaydedilen her bir spektrum 40 taramanın birleşmesinden oluşturuldu ve spektral rezolüsyon 4 cm^{-1} olarak seçildi.

Çalışmamızda bütün transetozom formülasyonları, kontrol formülasyonları ve çözeltiler ile yapılan in vitro deriden geçiş çalışması sonrası, her formüalsyon ile temas eden deri örneklerinin FT-IR spektrumu alındı. Ayrıca, herhangi bir formülasyon uygulaması yapılmayan bir deri örneği yüzeyinden de spektrum kaydı alındı ve sonucu kontrol olarak kullanıldı.

Analizlerde derinin *stratum corneum* tabakasındaki hücrelerarası lipitlerin alkil zincirlerinin hareketliliği ve durumu değerlendirildi. Bu kapsamda; 2920 ve 2850 cm^{-1} de asimetrik ve simetrik C-H gerilme bantlarından kaynaklanan absorbansların konumları ile pik alan ve yükseklikleri belirlendi (Ma ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016). Analizlerde Perkin Elmer Spectrum Version 6.0.2 bilgisayar programı kullanıldı.

3.2.16. Konfokal Lazer Mikroskop Analizi

Konfokal lazer mikroskop analizleri, ilaç taşıyıcı sistemine yüklenen etkin maddelerin ve veya taşıyıcı sistemin in vitro koşullarda gerçekleştirilen penetrayon çalışmasını takiben derinin hangi tabakalarına ulaştığının görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla, etkin maddenin kendisinin fluoresans vermemesi durumunda, etkin maddeye benzer lipofilik karakterde model bir madde olarak fluoresans veren bir madde taşıyıcı sisteme yüklenmektdir. Böylece, taşıyıcı sistemlerin veya etkin maddelerin derinin farklı tabakalarındaki birikimi veya lokalizasyonu görüntülenebilmektedir (Ma ve ark. 2015).

Çalışmamızda; floresans madde olarak tazaroten ve takrolimus gibi lipofilik bir molekül olan Nil Kırmızısı (log P: 3,8) (Mérian ve ark. 2012) kullanıldı. Bu amaçla, deriden penetrasyon çalışmalarında her iki etkin maddenin canlı epidermis ve dermiste en yüksek lokalizasyonu sağlayan transetozom formülasyolarına (TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1) etkin maddelerin yerine Nil Kırmızısı (1µg/ml) yüklendi.

Bu transetozomlardan Nil Kırmızısı deriye penetrasyonu için Yöntem 3.2.14.2'de belirletildiği gibi 24 saat süre ile çalışıldı. Nil Kırmızısı yüklü TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu transetozomların uygulandığı deri parçaları 24 saat sonunda Franz difüzyon hücrelerinden çıkartıldıktan sonra formülasyonun fazlası kağıt havlu ile silinerek uzaklaştırıldı. Kriyotom Cihazı (Thermo) ile deriden dikey olarak alınan 20 µm'lik kesitlerin ve 20 µm, 150 µm ve 400 µm'lik yatay kesitlerin konfokal mikroskop (Leica TCS SPE) ile incelenmesi ile model boyanın derinin farklı tabakalarındaki

dağılımı görüntülendi. Çalışmalarda kontrol olarak Nil Kırmızı'sının pH 7,4 PBS'deki çözeltisi (1µg/ml) içeren kullanıldı.

3.2.17. *İn vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür (MTT) yöntemi, canlı hücrelerdeki mitokondri aktivitesi sonucu ortaya çıkan kolorimetrik değişikliklerin ölçülmesi esasına dayanan bir sitotoksite testidir (Fotakis ve Timbrell 2006). Yöntemin esası; MTT bileşiğinin tetrazolyum halkasının mitokondriyel süksinat dehidrojenaz enzimi ile suda çözünmeyen koyu mavi-mor renkli formazan kristaline dönüşmesine dayanır. Canlı ve mitokondriyel fonksiyonları bozulmamış hücreler koyu mavi-mor renkli formazan kristallerini oluşturduğu için, ölü ve mitokondriyel fonksiyonu bozulmuş hücrelerin varlığında bu kristaller oluşamamaktadır.

Uygulama sonrası meydana gelen mavi-mor renkli formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) ile çözündürülür ve oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülerek uygulamadaki ürünün sitotoksik açıdan değerlendirilmesi yapılır. Hücre canlılığında meydana gelen değişiklikler, formazan kristallerinin miktarını etkilediği için, bu durum oluşan rengin şiddetine de (optik yoğunluk) yansımaktadır. Çözücü kontrolün %100 canlı olduğu kabul edilerek, ölçülen optik yoğunluk değerleri karşılaştırılır ve sitotoksisitesi belirlenir (Fotakis ve Timbrell 2006; Van Meerloo ve ark. 2011).

Transetozom formülasyonlarının (TZ 4-TW 1 kodlu boş ve tazaroten yüklü transetozom formülasyonları ile TC 4-SK 1 kodlu boş ve takrolimus yüklü transetozom) sitotoksik potansiyelleri; Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan (*American Type Cell Culture, ATCC*) temin edilen fare fibroblast (*BALB/3T3, clone A31)-(ATCC CCL-163TM, USA*) hücre dizisinde MTT yöntemi ile değerlendirildi.

Hücrelerin devamlılığı için %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 antibiyotik (100 IU/mL penisilin ve 100 mg/mL streptomisin) içeren besiyeri (*Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 (DMEM-F12*) içerisinde 37°C'de %5 CO2'li inkübatörde kültürü yapıldı. %80-85 kofluentlik sağlandığında hücrelere tripsinize edildi ve hücre canlılığı LUNA *Automated Cell Counter* (Logos Biosystem) cihazında tripan mavisi ile boyanarak tespit edildi. Hücreler 10^4 hücre/100 µL/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu mikroplakalara ekildikten sonra hücrelerin tutunması için 24 saat inkübe

edildi. Daha sonra hücreler transetozom formülasyonlarının farklı konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edildi. Ön çalışmalarda 30:70 etanol:su içerisinde hazırlanan formülasyonların 20µL'si 80µL besiyeriyle birlikte uygulandığında hücre ölümüne neden olmadığı gözlendi ve çalışılacak en yüksek konsantrasyon bu orana göre saptandı. DMEM-F12, 20:80 etanol-su:DMEM-F12 ve 1% sodyum dodesil sülfat (SDS) sırasıyla büyüme, çözücü ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. 24 saat maruziyetin ardından kuyucuklara 20µL MTT (5 mg/mL, fosfat tamponu (PBS) içinde) eklendi ve 3 saat 37°C'de inkübe edildi. Besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve formazan kristallerinin homojen mavi-mor renk oluşturması için 100µL DMSO eklenerek 5 dakika orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Optik dansiteler 590 nm'de (670 nm referans) mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede (Epoch) ölçüldü ve meydana gelen inhibisyon aşağıdaki Denklem 3.5'e göre hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - ({}_{ort}dOD_{formülasyon} / {}_{ort}dOD_{solvent\ kontrol}) x100 \qquad (3\text{-}5)$$

dOD: blank kuyucukların değerden çıkarılmasıyla elde edilen düzeltilmiş optik yoğunluk

Her formülasyon 3 kez tekrar edilerek ve aynı koşullarda farklı günlerde çalışılmak üzere toplam 6 tekrarlı olarak çalışıldı. % İnhibisyon – konsantrasyon eğrilerinin yardımıyla %50 inhibisyona neden olan konsantrasyon (IC_{50}) hesaplandı.

SDS için, 100mg/mL SDS stok çözeltisi (DMSO içinde) hazırlandı. Kuyucuktaki en yüksek konsantrasyon 100 µg/mL olacak şekilde seyreltilerek hücre maruziyeti gerçekleştirildi. DMEM-F12, 1% DMSO ve 1% sodyum dodesil sülfat (SDS) sırasıyla büyüme, solvent ve pozitif kontrol olarak kullanıldı. Onun IC_{50} değeri de hesaplanmıştır.

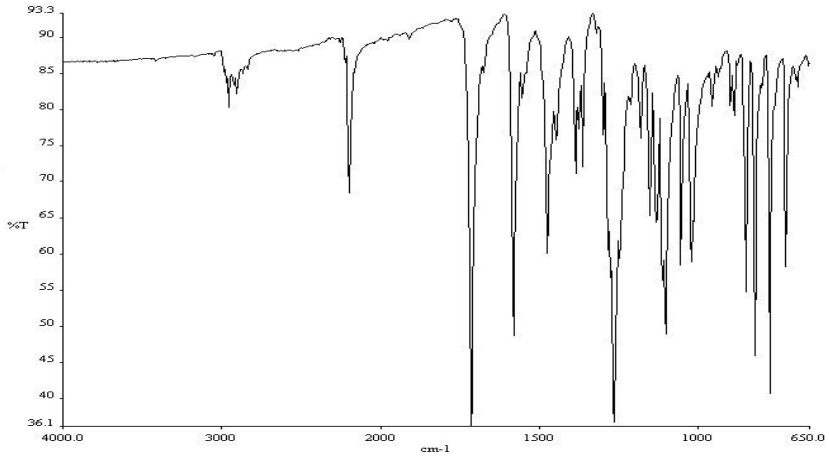
3.2.18. İstatistiksel Analiz

İn vitro deriye penetrasyon çalışmalarının sonuçları istatiksel olarak değerlendirilmek amacıyla GraphPad Prism 7, tek-yollu Anova, Dunnet's multiple Comparison Test kullanıldı. Anlamlı fark sınırı $p < 0,05$ olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Tazarotenin Infrared (IR) Spektrumu

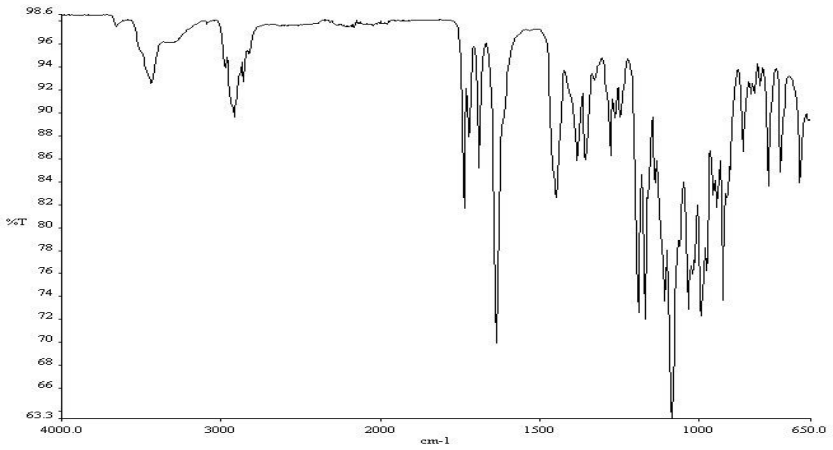
Yöntem 3.2.1'de bahsedildiği gibi gerçekleştirilen çalışmalar ile elde edilen tazarotenin FT-IR spektrumu Şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4-1: Tazarotenin IR spektrumu

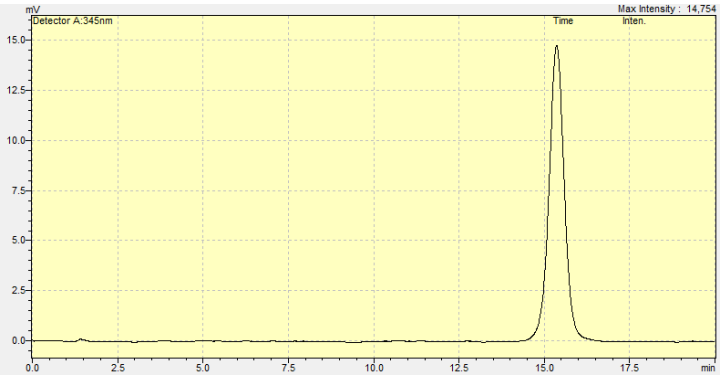
4.2. Takrolimusun Infrared (IR) Spektrumu

Yöntem 3.2.2'de bahsedildiği gibi gerçekleştirilen çalışmalar ile elde edilen takrolimusun FT-IR spektrumu Şekil 4.2' de verilmektedir.



Şekil 4-2: Takrolimusun IR spektrumu

4.3. Tazarotenin HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu



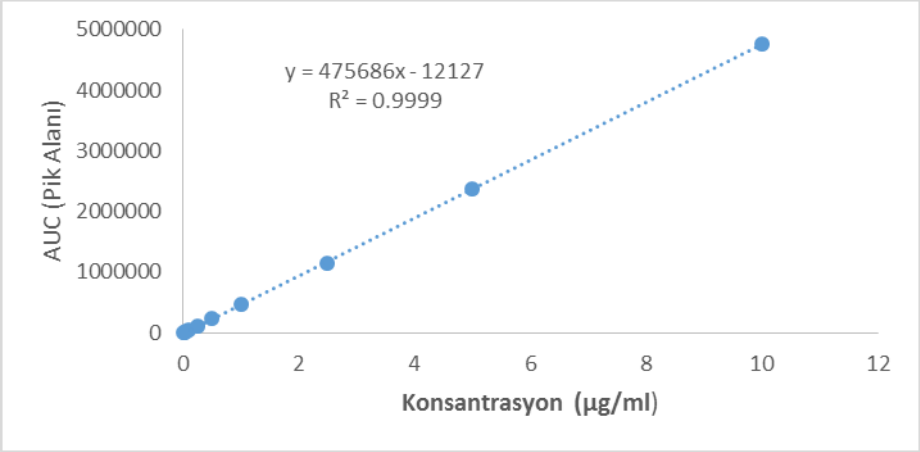
Şekil 4-3: Tazarotene ait HPLC Kromatogramı

4.3.1. Doğrusallık

Tazaroten HPLC yönteminin doğrusallık çalışması kapsamında; etkin madde konsantrasyonuna karşı elde edilen eğri altında kalan alan değerlerinin ortalamaları ile standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri Tablo 4.1'de sunulmuştur. Hesaplanan doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (r^2) Şekil: 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Tazarotenin HPLC yöntemine ait doğrusallık sonuçları (n=6)

Konsantrasyon (µg/ml)	Pik Alanların Ortalaması	SD (±)	RSD (%)
0,01	4150	47,88	1.15
0,025	9531,8	204,50	2,14
0,05	21352	193,40	0,90
0,1	42491	630,65	1,48
0,25	104220,7	1037,43	0,99
0,5	225712	3927,97	1,74
1	456885,7	4379,52	0,96
2,5	1138938	8651,06	0,76
5	2364806	33764,08	1,43
10	4755591	26109,88	0,55



y=Pik alanı; x= Konsantrasyon (µg/ml); r^2= Determinayon katsayısı

Şekil 4-4: Tazarotenin HPLC yöntemine ait kalibrasyon doğrusu

4.3.2. Kesinlik

Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları sırası ile Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4-2: Tazaroten HPLC analiz yönteminin gün içi kesinlik verileri (n=3)

Konsantrasyon	Pik alanın ortalaması	SD	% RSD
5 µg/ml	2352827	17007,23	0,723
1 µg/ml	452258,3	3184,65	0,704
0,1 µg/ml	41917,67	192,547	0,460

Tablo 4-3: Tazaroten HPLC analiz yönteminin günler arası kesinlik verileri (n=3)

Konsantrasyon	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Ortalama	SD	% RSD
5 µg/ml	2361001	2387833	2399359	2382731	19681,38	0,826
1 µg/ml	450994	453127	457319	453813.3	3217,87	0,709
0,1 µg/ml	41950	42589	41650	42063	479,59	1,140

4.3.3. Doğruluk

Tazaroten HPLC yöntemi doğru denkleminin üç farklı konsantrasyon için geri kazanma (%), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4-4: Tazarotenin HPLC yöntemi için doğruluk verileri (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	Geri kazanma (µg/ml)	Geri kazanma (%)	SD	RSD (%)
5	4,979	99,586	0,8442	0,8477
1	0,973	97,328	0,4167	0,4281
0,1	0,096	96,318	0,3473	0,3606

4.3.4. Seçicilik

Formülasyonlarda kullanılan bütün yardımcı maddeler ile deriden penetrasyon çalışmalarında kullanılan domuz derisi ve soyma işleminde kullanılan bantın, analizlerde tazarotenin alıkonma zamanında girişim yapmadığı tespit edilmiştir.

4.3.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayin Limiti

Denklem (3-1) ve (3-2)'ye göre yapılan hespalamlar ile optimize edilen HPLC analiz yöntemi için tazarotenin teşhis sınırı (TL) 0,00673 µg/ml ve miktar tayin sınırı (MTL) 0,020 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

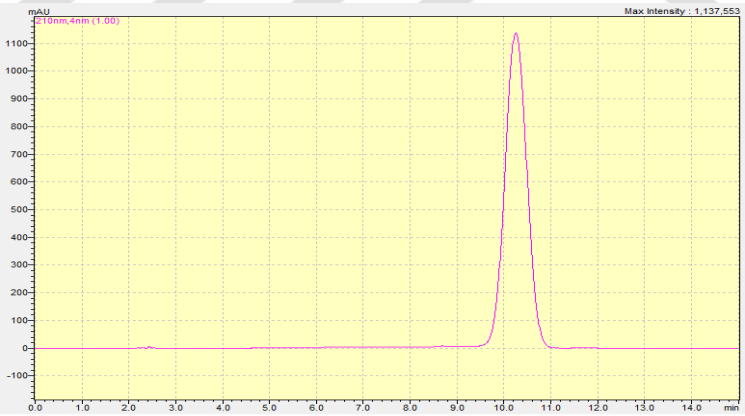
4.3.6. Örneklerin Stabilitesi

Yöntem 3.2.4.6'de anlatıldığı gibi çalışılarak, 48 saat süre ile etkin maddenin hazırlanan HPLC örneklerindeki stabilite bulguları Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4-5: Tazarotenin HPLC analizlerinde örneklerin stabilite sonuçları

Ölçüm Zamanı (saat)	Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/ml)
1	1	1,009
2	1	1,007
4	1	1,009
6	1	1,007
12	1	1,008
24	1	1,007
48	1	1,006
	Ortalama	1,008
	SD (±)	0,001
	RSD (±)	0,089

4.4. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu



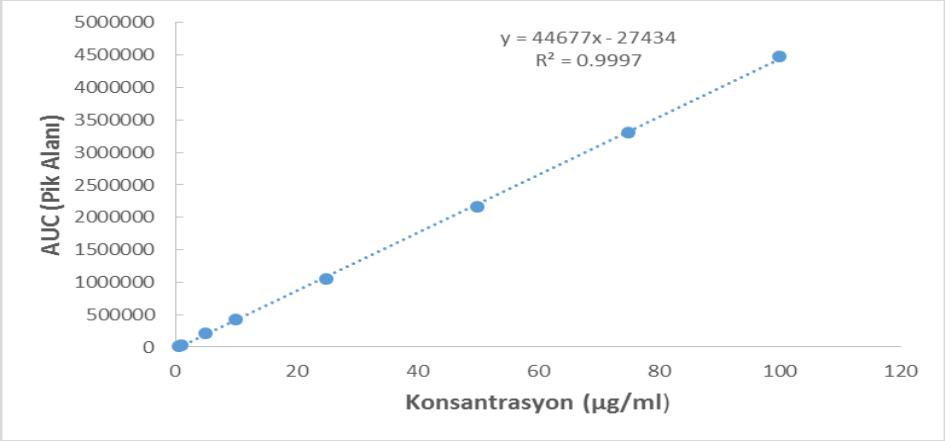
Şekil 4-5: Takrolimuse ait HPLC Kromatogramı

4.4.1. Doğrusallık

Takrolimus HPLC yönteminin doğrusallık çalışması kapsamında; etkin madde konsantrasyonuna karşı elde edilen eğri altında kalan alan değerlerinin ortalamaları ile standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) değerleri Tablo 4.6'de sunulmuştur. Hesaplanan doğru denklemi ve determinasyon katsayısı (r^2) Şekil 4.6'de verilmiştir.

Tablo 4-6: Takrolimusun HPLC yöntemine ait doğrusallık sonuçları (n=3)

Konsantrasyon (µg/ml)	Pik Alanların Ortalaması	SD (±)	RSD (%)
0,5	16359	983,3062	6,010796
1	32429,33	1369,475	4,222951
5	211134	2880,628	1,36436
10	421800,7	4961,1	1,176172
25	1054400	26812,54	2,54292
50	2157921	11834,07	0,548401
75	3313379	37201,49	1,122766
100	4479410	69450,17	1,550431



y=Pik alanı; x= Konsantrasyon (µg/ml); r^2= Determinayon katsayısı

Şekil 4-6: Takrolimusun HPLC yöntemine ait kalibrasyon doğrusu

4.4.2. Kesinlik

Yöntemin gün içi ve günler arası kesinlik sonuçları sırası ile Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4-7: Takrolimus HPLC analiz yönteminin gün içi için kesinlik verileri (n=3)

Konsantrasyon	Pik alanın ortalaması	SD	% RSD
50 µg/ml	2161521	14445,86	0,668
10 µg/ml	410856,7	5846,117	1,423
1 µg/ml	31905	481,8807	1,510

Tablo 4-8: Takrolimus HPLC analiz yönteminin günler arası için kesinlik verileri (n=3)

Konsantrasyon	Gün 1	Gün 2	Gün 3	Ortalama	SD	% RSD
50 µg/ml	2173175	2171476	2121269	2155307	29489,72	1,368
10 µg/ml	415396	427410	420003	420936,3	6061,137	1,439
1 µg/ml	32350	32217	33348	32638,33	618,177	1,894

4.4.3. Doğuruluk

Takrolimus HPLC yöntemi doğru denkleminin üç farklı konsantrasyon için geri kazanma (%), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (%RSD) değerleri Tablo 4.9'de verilmiştir.

Tablo 4-9: Takrolimusun HPLC yöntemi için doğuruluk verileri (n=3)

Konsantrasyon	Geri kazanma	Geri kazanma(%)	SD	% RSD
50 µg/ml	50,2685	100,5371	1,3130	1,3059
10 µg/ml	9,6042	96,04201	0,4723	0,4918
1 µg/ml	1,0064	100,6434	2,8502	2,8320

4.4.4. Seçicilik

Formülasyonlarda kullanılan bütün yardımcı maddeler, analizlerde takrolimusun alıkonma zamanında girişim yapmadığı tespit edilmiştir.

4.4.5. Teşhis Limiti ve Miktar Tayin Limiti

Denklem (3.1) ve (3.2)'ye göre yapılan hespalamlar ile optimize edilen HPLC analiz yöntemi için takrolimusun teşhis sınırı (TL) 0,048 µg/ml ve miktar tayini sınır (MTL) 0,146 µg/ml olarak hesaplanmıştır

4.4.6. Örneklerin stabilitesi

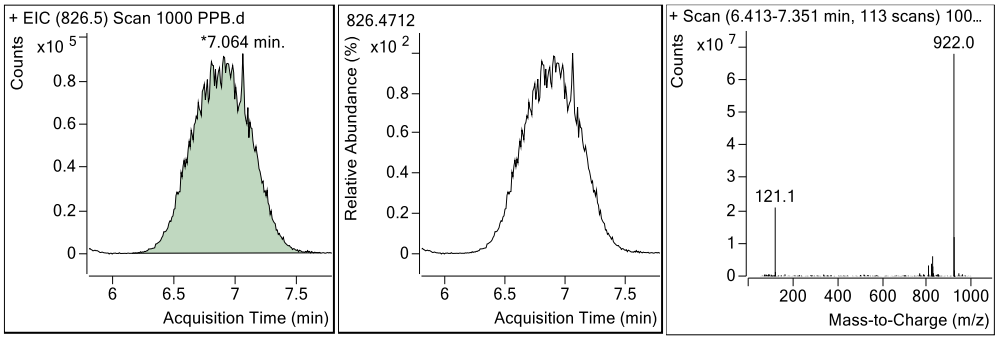
Yöntem 3.2.4.6'de anlatıldığı gibi çalışılarak, 48 saat süre ile etkin maddenin hazırlanan HPLC örneklerindeki stabilite bulguları Tablo 4.10'de verilmiştir.

Tablo 4-10: Takrolimusun HPLC analizlerindeki örneklerin stabilite sonuçları

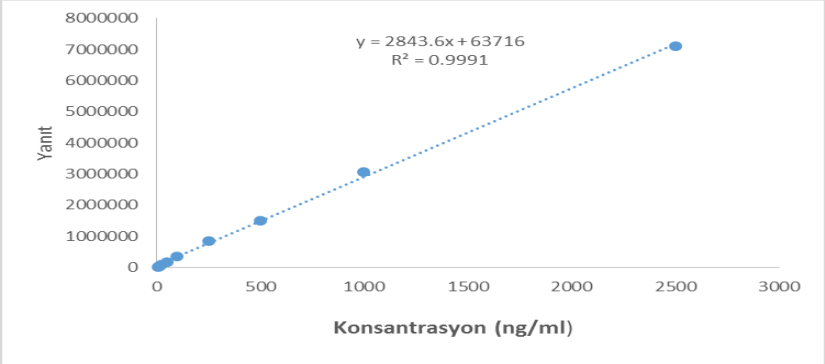
Ölçüm Zamanı (saat)	Teorik Konsantrasyon (µg/ml)	Hesaplanan Konsantrasyon (µg/ml)
1	10	10,08
2	10	10,10
4	10	10,13
6	10	10,12
12	10	10,09
24	10	10,11
48	10	10,13
	Ortalama	10,11
	SD (±)	0,020
	RSD (±)	0,201

4.5. Takrolimusun LC-MS Analiz Yöntemin Geliştirilmesi

Takrolimus LC-MS anaiz yöntemine ait örnek bir kromatogram Şekil 4.7'de ve doğru denklemi ile determinasyon katsayısı r^2 Tablo 4.11'de ve Şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4-7: Takrolimus LC-MS analiz yöntemine ait bir kromatogram (1000 ng/ml)



y= Toplam iyon kromatogramında her saniyede yapılan sayım;
x= Konsantrasyon (ng/ml); r^2= Determinasyon katsayısı

Şekil 4-8: Takrolimusun LC-MS metoduna ait kalibrasyon eğrisi

Tablo 4-11: Takrolimusun LC-MS metoduna ait kalibrasyon doğrusu

Konsantrasyon (ng/ml)	Verilen yanıt (m/z)
5	23939
10	42066
25	101734
50	178440
100	343505
250	838884
500	1508691
1000	3059650
2500	7102032

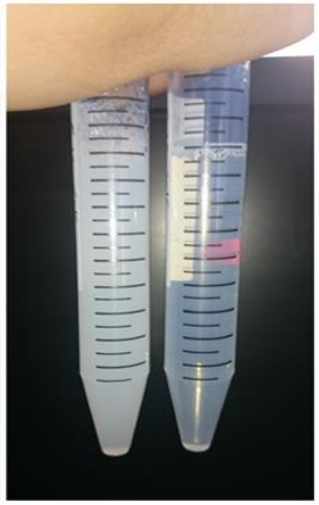
4.6. Transetozom Tipi Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Formülasyon Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Etkin madde yüklü transetozomların hazırlanması sırasında oluşan ince film tabakası Şekil 4.9'da gösterilmiştir.



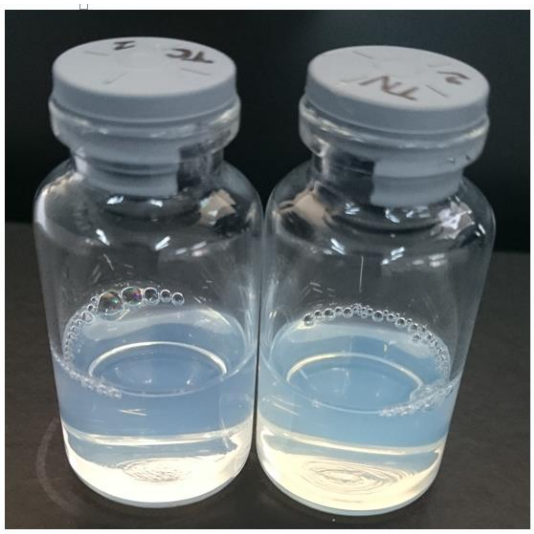
Şekil 4-9: Transetozomların hazırlanması aşamasında oluşan ince film tabakası

Hazırlanan transetozom filmlerinin hidratasyon sonrası uygulanan sonikasyon işlemi öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.10'de verilmiştir.



Şekil 4-10: Sonikasyon işlemi öncesi (sol tüp) ve sonrası (sağ tüp) transetozomların fiziksel görünümleri

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomların hazırlanması sonrası genel fiziksel görünümü Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4-11: Tazaroten yüklü transetozom (TZ 4-TW 1) (sağdaki şişe) ve takrolimus yüklü transetozomun (TC 4-SK 1) (soldaki şişe) fiziksel görünümü

4.6.1. Tazaroten Yüklü Transetozom Formülasyonlarınına Ait Bulgular

Formülasyon optimizasyonu çalışmaları kapsamında, öncelikle transetozom formülasyonlarına %0,1 oranında tazaroten yüklenmeye çalışıldı, ancak veziküller hazırlandıktan kısa bir süre sonra etkin maddenin çöktüğü gözlendi. Bu nedenle, daha sonra yürütülen bütün çalışmalarda tazarotenin %0,05 oranında transetozomlara yüklenmesine karar verildi.

Formülasyon optimizasyon çalışmaları verilerine göre, nanovezikül oluşması açısından uygun ve uygun olmayan (nanovezikül oluşmayan veya faz ayrımı gösteren) tazaroten yüklü transetozom formülasyonları bileşimlerindeki kenar aktivatörü veya penetrasyon arttırıcıya göre Tablo 4.12, Tablo 4.13 ve Tablo 4.14'de verilmiştir.

Tablo 4-12: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TZ 4-TW 1-10	4	Tween 80: 1	%10 Etanol / Su	Uygun
TZ 4-TW 1-20	4	Tween 80: 1	%20 Etanol / Su	Uygun
TZ 4-TW 1	4	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 4-TW 0,66-20	4	Tween 80: 0,66	%20 Etanol / Su	Uygun
TZ 4-TW 1-40	4	Tween 80: 1	%40 Etanol / Su	Uygun değil
TZ 4-TW 0,5	4	Tween 80: 0,5	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 4-TW 1,33	4	Tween 80: 1,33	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 3-TW 1	3	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 3-TW 0,53	3	Tween 80: 0,53	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 5-TW 1	5	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 6-TW 1	6	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su	Uygun değil

Tablo 4-13: Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TZ 4-SK 1-20	4	Sodyum kolat: 1	%20 Etanol / Su	Uygun
TZ 4-SK 1	4	Sodyum kolat: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 4-SK 0,66	4	Sodyum kolat: 0,66	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 3-SK 0,53	3	Sodyum kolat: 0,53	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 5-SK 1	5	Sodyum kolat: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 5-SK 0,55	5	Sodyum kolat: 0,55	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 6-SK 1	6	Sodyum kolat: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TZ 6-SK 0,66	6	Sodyum kolat: 0,66	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-14: Diğer sürfaktan tipi veya penetrasyon arttırıcı kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TZ 4-SP 1	4	Span 80: 1	%30 Etanol / Su	Uygun değil
TZ 4-SP85 1	4	Span 85: 1	%30 Etanol / Su	Uygun değil
TZ 4-OL 1	4	Oleik asit: 1	%30 Etanol / Su	Uygun değil

Bu formülasyonlardan uygun olarak nitelendirilen transetozomlar seçilerek, vezikül boyutu ve polidispersite indeksi değerleri ölçüldü. Ardından transetozomların fiziksel stabiliteleri değerlendirildi.

4.6.2. Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonlarına Ait Bulgular

Formülasyon optimizasyon çalışmaları verilerine göre, nanovezikül oluşması açısından uygun ve uygun olmayan (nanovezikül oluşmayan veya faz ayrımı gösteren) takrolimus yüklü transetozom formülasyonları bileşimlerindeki fosfolipit miktarı ve kenar aktivatörüne göre Tablo 4.15 ile Tablo 4.24'de verilmiştir.

Tablo 4-15: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 6-TW 2	(75:25)	6	Tween 80: 2	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 6-TW 1,5	(80:20)	6	Tween 80: 1,5	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 6-TW 1,058	(85:15)	6	Tween 80: 1,058	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 6-TW 0,66	(90:10)	6	Tween 80: 0,66	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-16: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 5-TW 1,66	(75:25)	5	Tween 80: 1,66	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 5-TW 1,25	(80:20)	5	Tween 80: 1,25	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 5-TW 0,88	(85:15)	5	Tween 80: 0,88	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 5-TW 0,555	(90:10)	5	Tween 80: 0,555	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-17: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 4-TW 1,33	(75:25)	4	Tween 80: 1,33	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-TW 1	(80:20)	4	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-TW 0,705	(85:15)	4	Tween 80: 0,705	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-TW 0,444	(90:10)	4	Tween 80: 0,444	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-TW 1-10	(80:20)	4	Tween 80: 1	%10 Etanol / Su	Uygun değil
TC 4-TW 1-20	(80:20)	4	Tween 80: 1	%20 Etanol / Su	Uygun
TC 4-TW 1-40	(80:20)	4	Tween 80: 1	%40 Etanol / Su	Uygun değil

Tablo 4-18: %3 fosfolipit ve kenar aktivatör olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 3-TW 1	(75:25)	3	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 3-TW 0,75	(80:20)	3	Tween 80: 0,75	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 3-TW 0,529	(85:15)	3	Tween 80: 0,529	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 3-TW 0,333	(90:10)	3	Tween 80: 0,333	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-19: %2 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 2-TW 0,66	(75:25)	2	Tween 80: 0,66	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 2-TW 0,5	(80:20)	2	Tween 80: 0,5	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 2-TW 0,353	(85:15)	2	Tween 80: 0,353	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 2-TW 0,222	(90:10)	2	Tween 80: 0,222	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-20: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 6-SK 2	(75:25)	6	Sodyum Kolat : 2	%30 Etanol / Su	Uygun değil
TC 6-SK 1,5	(80:20)	6	Sodyum Kolat: 1,5	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 6-SK 1,058	(85:15)	6	Sodyum Kolat:1,058	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 6-SK 0,666	(90:10)	6	Sodyum Kolat: 0,666	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-21: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 5-SK 1,66	(75:25)	5	Sodyum Kolat:1,66	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 5-SK 1,25	(80:20)	5	Sodyum Kolat:1,25	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 5-SK 0,88	(85:15)	5	Sodyum Kolat:0,88	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 5-SK 0,555	(90:10)	5	Sodyum Kolat:0,555	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-22: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 4-SK 1,33	(75:25)	4	Sodyum Kolat: 1,33	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-SK 1	(80:20)	4	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-SK 0,705	(85:15)	4	Sodyum Kolat: 0,705	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-SK 0,444	(90:10)	4	Sodyum Kolat: 0,444	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 4-SK 1-40	(80:20)	4	Sodyum Kolat: 1	%40 Etanol / Su	Uygun değil

Tablo 4-23: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 3-SK 1	(75:25)	3	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 3-SK 0,75	(80:20)	3	Sodyum Kolat: 0,75	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 3-SK 0,529	(85:15)	3	Sodyum Kolat: 0,529	%30 Etanol / Su	Uygun
TC 3-SK 0,333	(90:10)	3	Sodyum Kolat: 0,333	%30 Etanol / Su	Uygun

Tablo 4-24: %4 fosfolipit ve diğer kenar aktivatörü tipi veya penetrasyon arttırıcı kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonlara ait bulgular

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TC 4-SP85 1	(80:20)	4	Span 85: 1	%30 Etanol / su	Uygun değil
TC 4-SP 1	(80:20)	4	Span 80: 1	%30 Etanol / su	Uygun değil
TC 4-OL 1	(80:20)	4	Oleik Asit: 1	%30 Etanol / su	Uygun değil

4.7. Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Tipi Veziküler Sistemlere Ait Bulgular

Kontrol amaçlı kullanılmak üzere hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarına ait bulgular Tablo 4.25'te verilmiştir.

Tablo 4-25: Tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarına ait bulgular

Formülasyon kodu	Etkin Madde (%)	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı	Sonuç
TZ TR	0,05	4	Tween 80: 1	% 100 Su	Uygun
TZ ET	0,05	4	-	%30 Etanol / Su	Uygun
TC TR	0,1	4	Sodyum Kolat: 1	% 100 Su	Uygun
TC ET	0,1	4	-	%30 Etanol / Su	Uygun

4.8. Tazarotenin Propilen Glikoldeki Doymuş Çözeltisi ile Tazaroten ve Takrolimusun Hidroetanolik Doymuş Çözeltilerine Ait Bulgular

Çözünürlük çalışması sonucu tazaroten ve takrolimus sırasıyle Tablo 4.26 ve Tablo 4.27'de verilmiştir.

Tablo 4-26: Tazarotenin çözünürlük tayinine ait sonuçlar (n=3)

Ortam	Çözünen Tazaroten (µg/ml)	±SD
Etanol:H_2O (30:70)	2,771	0,376
Propilen glikol	593,93	15,29

Tablo 4-27: Takrolimusun çözünürlük tayinine ait sonuçlar (n=3)

Ortam	Çözünen Takrolimus (µg/ml)	±SD
Etanol:H_2O (30:70)	315,02	17,26

4.9. Optimize Edilen Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transetozom Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.9.1. Vezikül Boyutu ve Polidispersite İndeksi

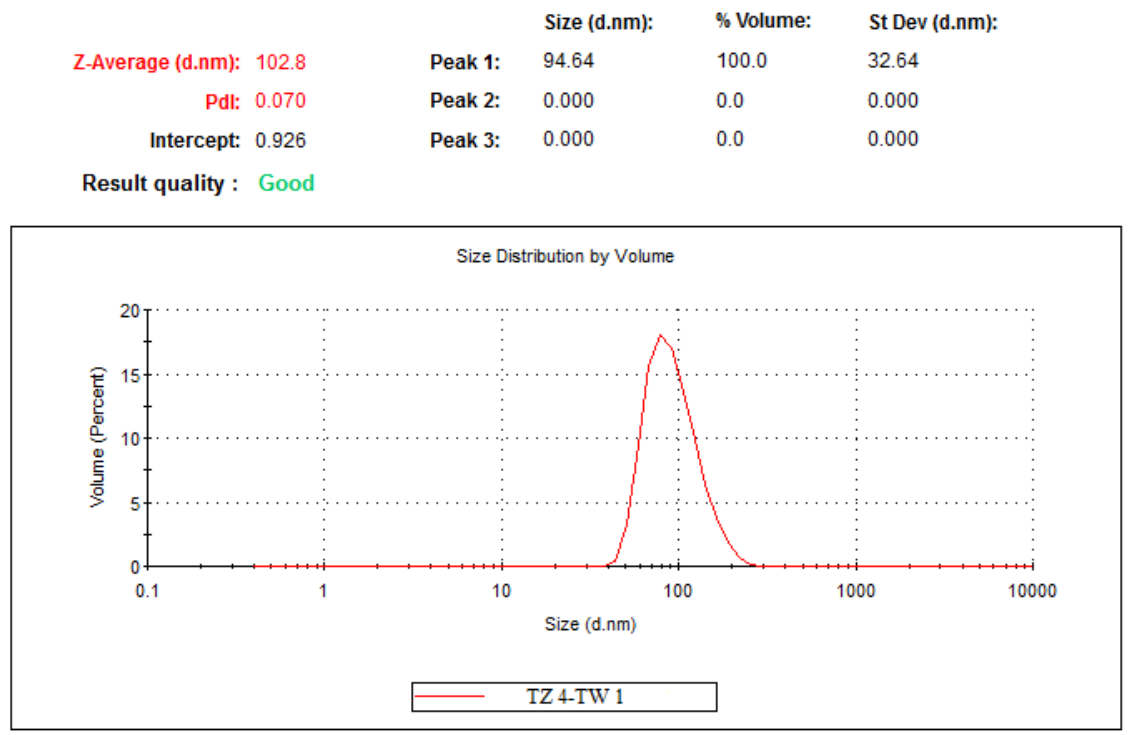
Optimizasyon çalışmaları sonuçlarına göre uygun bulunan tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının vezikül boyutu ve polidispersite indeksi değerleri Tablo 4.28 ile Tablo 4.29'da verilmiştir. Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonlarının vezikül boyutu ölçümlerine ait örnek grafik Şekil 4.12'de gösterildi.

Tablo 4-28: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlarının vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TZ 4-TW 1-10	77,32 ± 5,273	0,371 ± 0,004
TZ 4-TW 1-20	67,09 ± 1,047	0,103 ± 0,008
TZ 4-TW 1	101,07 ± 3,797	0,090 ± 0,011
TZ 4-TW 0,66-20	66,09 ± 4,855	0,177 ± 0,011
TZ 4-TW 0,5	73,56 ± 6,229	0,067 ± 0,011
TZ 4-TW 1,33	131,01 ± 1,069	0,128 ± 0,019
TZ 3-TW 1	119,32 ± 1,405	0,123 ± 0,018
TZ 3-TW 0,53	87,07 ± 12,516	0,208 ± 0,046
TZ 5-TW 1	85,28 ± 2,786	0,0985 ± 0,003

Tablo 4-29: Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü formülasyonlarının vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TZ 4-SK 1-20	49,88 ± 5,331	0,287 ± 0,065
TZ 4-SK 1	62,85 ± 5,414	0,097 ± 0,017
TZ 4-SK 0,66	56,32 ± 3,422	0,113 ± 0,010
TZ 3-SK 0,53	54,17 ± 9,807	0,095 ± 0,016
TZ 5-SK 1	45,29 ± 1,243	0,106 ± 0,007
TZ 5-SK 0,55	49,31 ± 0,250	0,176 ± 0,008
TZ 6-SK 1	52,28 ± 1,616	0,137 ± 0,013
TZ 6-SK 0,66	45,25 ± 0,065	0,220 ± 0,011



Şekil 4-12: TZ 4-TW 1 kodlu tazaroten yüklü transetozomun vezikül boyutu ve polidispersite indeksi

Optimizasyon çalışmaları sonuçlarına göre uygun bulunan takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının vezikül boyutu ve polidispersite indeksi değerleri Tablo 4.30 ile Tablo 4.38'de verilmiştir. Takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonlarının vezikül boyutu ölçümlerine ait örnek grafik Şekil 4.13'te gösterildi.

Tablo 4-30: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 6-TW 2	145,51 ± 5,888	0,208 ± 0,012
TC 6-TW 1,5	138,02 ± 2,189	0,222 ± 0,018
TC 6-TW 1,058	134,22 ± 5,651	0,326 ± 0,021
TC 6-TW 0,66	80,96 ± 4,245	0,124 ± 0,007

Tablo 4-31: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 5-TW 1,66	227,22 ± 1,51	0,280 ± 0,004
TC 5-TW 1,25	208,73 ± 6,296	0,393 ± 0,017
TC 5-TW 0,88	107,71 ± 9,722	0,208 ± 0,008
TC 5-TW 0,555	85,89 ± 1,078	0,108 ± 0,018

Tablo 4-32: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 4-TW 1,33	148,33 ± 8,887	0,169 ± 0,017
TC 4-TW 1	126,24 ± 6,354	0,147 ± 0,008
TC 4-TW 0,705	110,71 ± 3,403	0,118 ± 0,009
TC 4-TW 0,444	92,37 ± 4,197	0,093 ± 0,008
TC 4-TW 1-20	69,26 ± 2,035	0,108 ± 0,008

Tablo 4-33: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 3-TW 1	153,42 ± 12,804	0,163 ± 0,011
TC 3-TW 0,75	129,20 ± 3,512	0,109 ± 0,04
TC 3-TW 0,529	102,55 ± 3,812	0,089 ± 0,014
TC 3-TW 0,333	87,12 ± 2,594	0,051± 0,023

Tablo 4-34: %2 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 2-TW 0,66	162,14 ± 2,316	0,092 ± 0,012
TC 2-TW 0,5	150,61 ± 1,418	0,119 ± 0,028
TC 2-TW 0,353	106,42 ± 3.606	0,059 ± 0.037
TC 2-TW 0,222	82,00 ± 2,500	0,047 ± 0,038

Tablo 4-35: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 6-SK 1,5	82,55 ± 5,362	0,124 ± 0,008
TC 6-SK 1,058	61,04 ± 6,994	0,163 ± 0,006
TC 6-SK 0,666	44,96 ± 2,96	0,154 ± 0,015

Tablo 4-36: %5 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

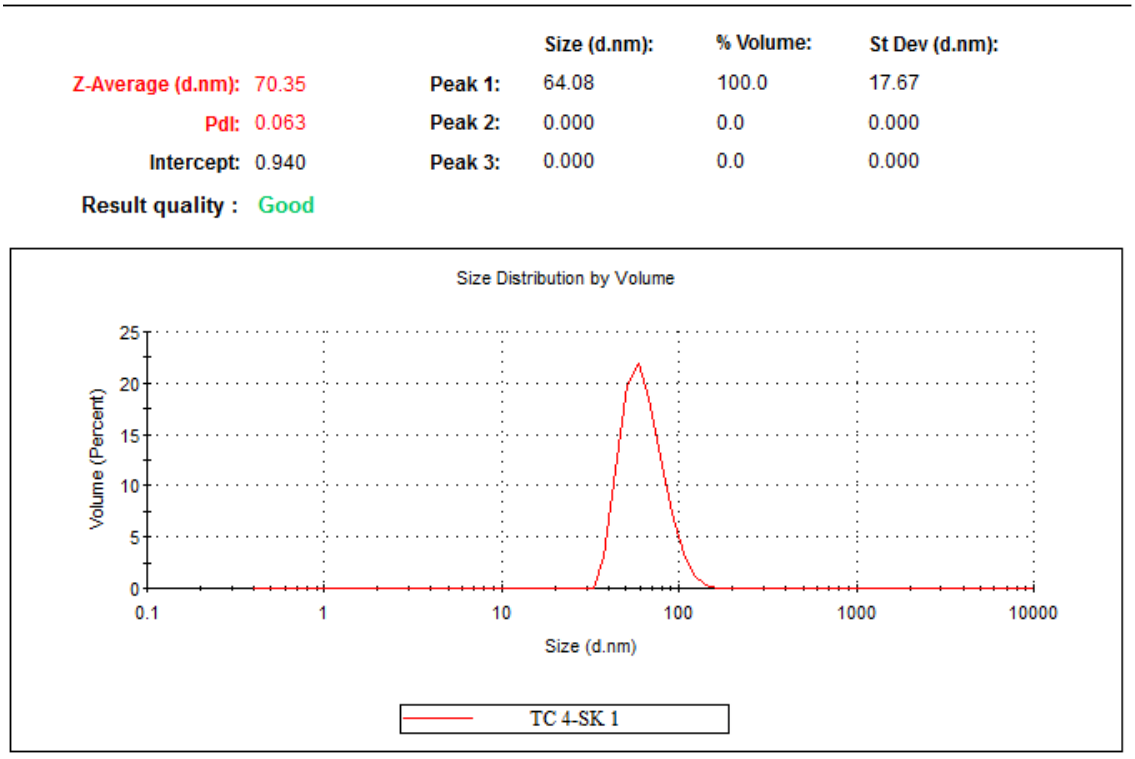
Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 5-SK 1,66	189,43 ± 5,516	0,229 ± 0,030
TC 5-SK 1,25	71,49 ± 6,88	0,085 ± 0,021
TC 5-SK 0,88	61,88 ± 2,120	0,120 ± 0,009
TC 5-SK 0,555	51,45 ± 2,251	0,127 ± 0,005

Tablo 4-37: %4 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 4-SK 1,33	95,58 ± 9,953	0,076 ± 0,018
TC 4-SK 1	70,41 ± 3,227	0,082 ± 0,008
TC 4-SK 0,705	62,12 ± 4,363	0,101 ± 0,009
TC 4-SK 0,444	56,19 ± 5,554	0,129 ± 0,007

Tablo 4-38: %3 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Sodyom kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TC 3-SK 1	75,76 ± 4,547	0,053 ± 0,009
TC 3-SK 0,75	64,42 ± 3,27	0,065 ± 0,015
TC 3-SK 0,529	53,41 ± 1,23	0,124 ± 0,032
TC 3-SK 0,333	52,99 ± 4,903	0,128 ± 0,014



Şekil 4-13: TC 4-SK 1 kodlu takrolimus yüklü transetozomun vezikül boyutu ve polidispersite indeksi

4.9.2. Fiziksel Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomların oda sıcaklığında (25°C±2°C, %60±5 RH) saklandığında, kısa bir sürede boyutta aşırı artış gözlendiği için bu saklama koşulu uygun olmadığına sonuçlandı.

Tazaroten Yüklü Transetozomların Stabilitelerinin Değerlendirilmesi

Buzdolabında (5±3 °C) bekletilerek fiziksel kararlılıkları incelelen tazaroten yüklü transetozomların görünümleri ve vezikül boyutu ölçümlerine ait PDI dikkate alınarak; 1 haftadan daha kısa sürede çökme gösteren ve yüksek PDI değerine sahip formülasyonlar daha sonraki karakterizasyon çalışmalarına alınmayarak elendi.

Fiziksel kararlılığı ve PDI değerlerine göre seçilen tazaroten yüklü transetozomlar Tablo 4.39 ve Tablo 4.40'te verilmiştir.

Tablo 4-39: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozomların 5 ± 3°C'deki fiziksel kararlılığı

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Fiziksel Kararlılık	Sonuç
TZ 4-TW 1-10	Bir hafta tamamlamadan çökme	Seçilmedi, PDI de yuksek
TZ 4-TW 1-20	3 hafta stabil	Seçildi
TZ 4-TW 1	3 hafta stabil	Seçildi
TZ 4-TW 0,66-20	1 hafta çökme	Seçilmedi
TZ 4-TW 0,5	3 hafta stabil	Seçildi
TZ 4-TW 1,33	3 hafta stabil	Seçildi
TZ 3-TW 1	3 hafta stabil	Seçildi
TZ 3-TW 0,53	1 hafta çökme	Seçilmedi, PDI de yüksek
TZ 5-TW 1	3 hafta stabil	Seçildi

Tablo 4-40: Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozomların 5 ± 3°C'deki fiziksel kararlılığı

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Fiziksel Kararlılık	Sonuç
TZ 4-SK 1-20	1 hafta çökme	Seçilmedi, PDI yüksek
TZ 4-SK 1	3 hafta stabil	Seçildi
TZ 4-SK 0,66	1 hafta çökme	Seçilmedi
TZ 3-SK 0,53	2 günde çökme	Seçilmedi
TZ 5-SK 1	1 hafta çökme	Seçilmedi
TZ 5-SK 0,55	1 hafta çökme	Seçilmedi
TZ 6-SK 1	3 hafta stabil	Seçildi
TZ 6-SK 0,66	2 hafta stabil	Seçilmedi, PDI de yuksek

Tablo 4.39 ve Tablo 4.40'teki seçilen tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının 5±3 °C'de üç hafta bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılmı bulguları Tablo 4.41 ve Tablo 4.42'de verilmiştir.

Tablo 4-41: Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozomların 5±3°C'de 3 hafta bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5 ± 3°C'de Fiziksel Stabilite Bulguları		
	Zaman (Gün)	Boyut (nm)	PDI
TZ 4-TW 1-20	0	67,09 ± 1,047	0,103 ± 0,008
	7	72,07 ± 3,792	0,111 ± 0,018
	14	72,71 ± 1,772	0,136 ± 0,010
	21	82,42 ± 3,006	0,140 ± 0,017
TZ 4-TW 1	0	101,07 ± 3,797	0,090 ± 0,011
	7	116,01 ± 4,42	0,141 ± 0,003
	14	128,91 ± 3,272	0,155 ± 0,023
	21	136,30 ± 7,35	0,156 ± 0,052
TZ 4-TW 0,5	0	73,56 ± 6,229	0,067 ± 0,011
	7	83,43 ± 2,882	0,145 ± 0,096
	14	89,10 ± 1,813	0,111 ± 0,049
	21	134,82 ± 37,05	0,251 ± 0,019
TZ 4-TW 1,33	0	131,01 ± 1,069	0,128 ± 0,019
	7	146,72 ± 6,531	0,154 ± 0,008
	14	153,02 ± 8,505	0,194 ± 0,044
	21	165,06 ± 10,54	0,241 ± 0,019
TZ 3-TW 1	0	119,32 ± 1,405	0,123 ± 0,018
	7	138,04 ± 3,124	0,132 ± 0,030
	14	139,95 ± 4,695	0,166 ± 0,026
	21	157,08 ± 6,431	0,242 ± 0,037
TZ 5-TW 1	0	85,28 ± 2,786	0,0985 ± 0,003
	7	115,94 ± 5,204	0,105 ± 0,047
	14	115,12 ± 5,974	0,106 ± 0,043
	21	123,24 ± 6,643	0,107 ± 0,024

Tablo 4-42: Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak tazaroten yüklü transetozomların 5±3°C'de 3 hafta bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Gün)	Boyut (nm)	PDI
TZ 4-SK 1	0	62,85 ± 5,414	0,097 ± 0,017
	7	88,73 ± 3,984	0,129 ± 0,033
	14	93,12 ± 4,488	0,138 ± 0,020
	21	94,03 ± 2,651	0,197 ± 0,018
TZ 6-SK 1	0	52,28 ± 1,616	0,137 ± 0,013
	7	73,62 ± 4,893	0,158 ± 0,010
	14	76,25 ± 1,731	0,176 ± 0,011
	21	85,62 ± 2,129	0,208 ± 0,027

Sonraki karakterizasyon çalışmalarına seçilen tazaroten yüklü transetozom formülasyonların bileşenleri Tablo 4.43'te verilmiştir.

Tablo 4-43: Seçilen tazaroten yüklü transetozom formülasyonların bileşenleri

Formülasyon kodu	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TZ 4-TW 1	4	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TZ 3-TW 1	3	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TZ 4-TW 1- 20	4	Tween 80: 1	%20 Etanol / Su
TZ 5-TW 1	5	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TZ 4-SK 1	4	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su
TZ 4-TW 0,5	4	Tween 80: 0,5	%30 Etanol / Su
TZ 4- TW 1,33	4	Tween 80: 1,33	%30 Etanol / Su
TZ 6- SK 1	6	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su

Takrolimus Yüklü Transetozomların Stabilitesinin Değerlendirilmesi

Optimizasyon çalışmaları verilerine göre uygun bulunarak seçilen ve Tablo 4.15 - Tablo 4.23'te verilen takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının 5±3 °C'de dört ay süre ile bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılmı bulguları Tablo 4.44 - Tablo 4.52'de verilmiştir.

Tablo 4-44: %6 fosfolipit ve kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 ºC'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 6-TW 2	0	145,51 ± 5,888	0,208 ± 0,012
	1	164,82 ± 2,608	0,237 ± 0,005
	2	184,43 ± 3,232	0,253 ± 0,033
	3	191,94 ± 6,144	0,272 ± 0,017
	4	195,41 ± 2,572	0,288 ± 0,012
TC 6-TW 1,5	0	138,02 ± 2,189	0,222 ± 0,018
	1	159,90 ± 4,389	0,223 ± 0,009
	2	199,52 ± 7,862	0,243 ± 0,058
	3	254.31 ± 4,366	0.407 ± 0,025
	4	282,54 ± 15,59	0,411 ± 0,030
TC 6-TW 1,058	0	134,22 ± 5,651	0,326 ± 0,021
	1	140,41 ± 4,68	0,334 ± 0,029
	2	156,73 ± 2,435	0,343 ± 0,023
	3	160,10 ± 3,815	0,353 ± 0,008
	4	174,22 ± 1,386	0,387 ± 0,024
TC 6-TW 0,66	0	80,96 ± 4,245	0,124 ± 0,007
	1	94,86 ± 2,464	0,141 ± 0,007
	2	109,4 ± 2,358	0,206 ± 0,013
	3	108,9 ± 1,234	0,222 ± 0,013
	4	125,0 ± 8,412	0,253 ± 0,005

Tablo 4-45: %5 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5°C ± 3°C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Fomülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 5-TW 1,66	0	227,22 ± 1,51	0,280 ± 0,004
	1	269,7 ± 11,29	0,268 ± 0,015
	2	287,5 ± 3.659	0,268 ± 0,015
	3	304,0 ± 6,108	0,433 ± 0,005
	4	315,7 ± 5,532	0,401 ± 0,052
TC 5-TW 1,25	0	208,73 ± 6,296	0,393 ± 0,017
	1	225,3 ± 2,285	0,398 ± 0,008
	2	228,9 ± 2,765	0,398 ± 0,006
	3	251,9 ± 7,235	0,412 ± 0,034
	4	268,4 ± 7,824	0,414 ± 0,006
TC 5-TW 0,88	0	107,71 ± 9,722	0,208 ± 0,008
	1	132,5 ± 8,416	0,233 ± 0,010
	2	143,6 ± 8,124	0,237 ± 0,012
	3	150,7 ± 6,395	0,237 ± 0,019
	4	158,2 ± 9,68	0,247 ± 0,008
TC 5-TW 0,555	0	85,89 ± 1,078	0,108 ± 0,018
	1	99,31 ± 2,236	0,114 ± 0,016
	2	110,0 ± 4,910	0,152 ± 0,010
	3	113,4 ± 4,128	0,181 ± 0,019
	4	122,0 ± 1,474	0,223 ± 0,008

Tablo 4-46: %4 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 °C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Fomülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 4-TW 1,33	0	148,33 ± 8,887	0,169 ± 0,017
	1	180,1 ± 5,887	0,199 ± 0,003
	2	210,76 ± 9,987	0,204 ± 0,016
	3	254,3 ± 4,366	0,211 ± 0,025
	4	254,5 ± 3,121	0,238 ± 0,021
TC 4-TW 1	0	126,24 ± 6,354	0,147 ± 0,008
	1	149,8 ± 9,074	0,165 ± 0,025
	2	161,0 ± 2,166	0,169 ± 0,032
	3	181,9 ± 6,282	0,217 ± 0,042
	4	188,4 ± 2,600	0,218 ± 0,010
TC 4-TW 0,705	0	110,71 ± 3,403	0,118 ± 0,009
	1	122,3 ± 1,457	0,139 ± 0,027
	2	138,1 ± 1,353	0,171 ± 0,015
	3	157,3 ± 5,256	0,202 ± 0,025
	4	175,5 ± 2,829	0,249 ± 0,017
TC 4-TW 0,444	0	92,37 ± 4,197	0,093 ± 0,008
	1	105,5 ± 3,509	0,098 ± 0,011
	2	113,4 ± 4,332	0,108 ± 0,013
	3	116,1 ± 1,819	0,158 ± 0,014
	4	124,5 ± 3,251	0,168 ± 0,023
TC 4-TW 1- 20	0	69,26 ± 2,035	0,108 ± 0,008
	1	72,23 ± 1,050	0,110 ± 0,016
	2	77,43 ± 1,608	0,112 ± 0,023
	3	78,35 ±1,969	0,115 ± 0,020
	4	89,59 ± 3,871	0,135 ± 0,016

Tablo 4-47: %3 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 °C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 3-TW 1	0	153,42 ±12,804	0,163 ± 0,011
	1	234,6 ± 9,907	0,168 ± 0,015
	2	289,3 ± 7,531	0,188 ± 0,009
	3	335,6 ± 11,235	0,230 ± 0,019
	4	369,3 ± 6,165	0,236 ± 0,027
TC 3-TW 0,75	0	129,20 ± 3,512	0,109 ± 0,04
	1	150,8 ± 2,307	0,128 ± 0,011
	2	155,4 ± 3,754	0,140 ± 0,019
	3	166,6 ± 4,350	0,143 ± 0,017
	4	176,91 ± 1,704	0,175 ± 0,017
TC 3-TW 0,529	0	102,55 ± 3,812	0,089 ± 0,014
	1	118,55 ± 10,496	0,093 ± 0,016
	2	126,65 ± 8,839	0,103 ± 0,010
	3	140,4 ± 4.549	0,104 ± 0,016
	4	146,9 ± 2,960	0,133 ± 0,011
TC 3-TW 0,333	0	87,12 ± 2,594	0,051 ± 0,023
	1	99,06 ± 2,750	0,09 ± 0,013
	2	109,7 ± 3,315	0,098 ± 0,027
	3	110,1 ± 1,320	0,115 ± 0,037
	4	120,6 ± 1,848	0,133 ± 0,011

Tablo 4-48: %2 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 5±3 °C'de 4 ay bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 2-TW 0,66	0	162,14 ±2,316	0,092 ± 0,012
	1	204,8±4,581	0,104 ± 0,042
	2	235,5±6,568	0,131 ± 0,032
	3	241,6±4,356	0,149 ± 0,020
	4	271,9±5,518	0,147 ± 0,015
TC 2-TW 0,5	0	150,61 ± 1,418	0,119 ± 0,028
	1	185,6 ± 1,401	0,156 ± 0,008
	2	211,8 ± 4,158	0,132 ± 0,021
	3	233,9 ± 3,842	0,160 ± 0,013
	4	254,3 ± 4,366	0,211± 0,025
TC 2-TW 0,353	0	106,42 ± 3,606	0,059 ± 0,037
	1	119,3 ± 1,850	0,094 ± 0,002
	2	138,7 ± 2,685	0,098 ± 0,012
	3	143,4 ± 3,692	0,094 ± 0,010
	4	157,8 ± 2,654	0,119 ± 0,034
TC 2-TW 0,222	0	82,00 ± 2,500	0,047 ± 0,038
	1	91,38 ± 3,480	0,065 ± 0,016
	2	104,4 ± 2,539	0,083 ± 0,017
	3	106,8 ± 3,274	0,105 ± 0,006
	4	120,9 ± 5,402	0,125 ± 0,049

Tablo 4-49: %6 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 6-SK 1,5	0	82,55 ± 5,362	0,124 ± 0,008
	1	116,9 ± 4,103	0,206 ± 0,009
	2	126,8 ± 2,692	0,233 ± 0,004
	3	133,8 ± 3,4509	0,270 ± 0,016
	4	149,9 ± 3,822	0,295 ± 0,014
TC 6-SK 1,058	0	61,04 ± 6,994	0,163 ± 0,006
	1	85,72 ± 2,69	0,221 ± 0,016
	2	86,19 ± 1,248	0,246 ± 0,003
	3	94,66 ± 2,221	0,269 ± 0,020
	4	99,33 ± 2,366	0,275 ± 0,012
TC 6-SK 0,666	0	44,96 ± 2,96	0,154 ± 0,015
	1	55,85 ± 3,183	0,185 ± 0,009
	2	61,63 ± 6,11	0,294 ± 0,030
	3	107,7 ± 7,060	0,528 ± 0,093
	4	118,4 ± 5,188	0,575 ±0,032

Tablo 4-50: %5 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 5-SK 1,66	0	189,43 ± 5,516	0,229 ± 0,030
	1	267,8 ± 9,458	0,378 ± 0,062
	2	323,6 ± 3,345	0,579 ± 0,008
	3	405,5 ± 39,23	0,791 ± 0,182
	4	530,7 ± 26,11	0,718 ± 0,091
TC 5-SK 1,25	0	71,49 ± 6,88	0,085 ± 0,021
	1	107,7 ± 2,511	0,123 ± 0,013
	2	119,9 ± 4,020	0,163 ± 0,009
	3	139,0 ± 5,541	0,230 ± 0,011
	4	142,9 ± 1,607	0,290 ± 0,039
TC 5-SK 0,88	0	61,88 ± 2,120	0,120 ± 0,009
	1	84,81 ± 1,564	0,179 ± 0,023
	2	91,34 ± 1,216	0,193 ± 0,019
	3	95,47 ± 2,781	0,233 ± 0,033
	4	99,23 ± 3,496	0,387 ± 0,021
TC 5-SK 0,555	0	51,45 ± 2,251	0,127 ± 0,005
	1	64,66 ± 1,968	0,182 ± 0,017
	2	64,45 ± 3,401	0,190 ± 0,011
	3	71,20 ± 2,888	0,198 ± 0,009
	4	85,33 ± 2,817	0,385 ± 0,005

Tablo 4-51: %4 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 4-SK 1,33	0	95,58 ± 9,953	0,076 ± 0,018
	1	137,69 ± 8,732	0,161 ± 0,009
	2	163,5 ± 5,617	0,174 ± 0,07
	3	177,9 ± 2,097	0,208 ± 0,014
	4	187,9 ± 3,066	0,219 ± 0,041
TC 4-SK 1	0	70,41 ± 3,227	0,082 ± 0,008
	1	97,86 ± 4,129	0,120 ± 0,016
	2	112,4 ± 2,304	0,123 ± 0,010
	3	121,5 ± 2,419	0,169 ± 0,010
	4	130,61 ± 1,358	0,179 ± 0,017
TC 4-SK 0,705	0	62,12 ± 4,363	0,101 ± 0,009
	1	92,23 ± 1,574	0,135 ± 0,015
	2	98,22 ± 1,057	0,162 ± 0,011
	3	99,77 ± 2,015	0,176 ± 0,029
	4	105,5 ± 1,447	0,180 ± 0,025
TC 4-SK 0,444	0	56,19 ± 5,554	0,129 ± 0,007
	1	71,24 ± 3,763	0,137 ± 0,018
	2	73,44 ± 4,582	0,194 ± 0,001
	3	81,10 ± 2,200	0,197 ± 0,019
	4	81,13 ± 2,034	0,202 ± 0,006

Tablo 4-52: %3 fosfolipit ve Kenar aktivatörü olarak Sodyum kolat kullanılarak hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların 4 ay 5°C ± 3°C'de bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Formülasyon Kodu	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman (Ay)	Boyut (nm)	PDI
TC 3-SK 1	0	75,76 ± 4,547	0,053 ± 0,009
	1	108,4 ± 1,106	0,096 ± 0,023
	2	119,6 ± 2,122	0,100 ± 0,022
	3	127,7 ± 6,755	0,125 ± 0,034
	4	147,1 ± 4,903	0,174 ±0,100
TC 3-SK 0,75	0	64,42 ± 3,27	0,065 ± 0,015
	1	85,43 ± 5,21	0,104 ± 0,016
	2	99,76 ± 4,749	0,129 ± 0,028
	3	101,6 ± 1,918	0,167 ± 0,013
	4	100,9 ± 1,774	0,192 ± 0,013
TC 3-SK 0,529	0	53,41 ± 1,23	0,124 ± 0,032
	1	67,56 ± 2,811	0,152 ± 0,020
	2	69,23 ± 1,394	0,157 ± 0,016
	3	74,03 ± 1,480	0,219 ± 0,012
	4	93,94 ± 2,699	0,253 ± 0,017
TC 3-SK 0,333	0	52,99 ± 4,903	0,128 ± 0,014
	1	73,24 ± 5,415	0,124 ± 0,019
	2	74,13 ± 2,786	0,133 ± 0,010
	3	79,52 ± 5,641	0,154 ± 0,008
	4	82,42 ± 4,960	0,160 ± 0,003

Buzdolabında 4 ay bekletilmeleri sonucu fiziksel stabiliteleri uygun bulunan takrolimus yüklü transetozomların vezikül boyutu ve bileşenleri dikkate alınarak deriye penetrasyon çalışmaları için seçildi. Formülasyonların seçiminde dikkate alınan parametreler aşağıda verilmiştir.:

- Takrolimusun lipofilik ve hidrofilik özelliği dikkate alınarak %20 etanol içeren "**TC 4-TW 1-20**" kodlu transetozom formülasyonu *in vitro* deriye penetrasyon çalışmaları için seçilmedi.
- vezikül boyutu ve dağılımlarının yüksek olması nedeniyle % 5 ve 6 fosfolipit ile sürfaktan olarak Tween 80 içeren transetozomların fomülasyonlar, (90:10) fosfolipit: kenar aktivatörün oranından dışında, *in vitro* deriye penetrasyon çalışmaları için seçilmedi.
- Fosfolipit: sürfaktan oranı (90:10) olan transetozomların bileşiminde kenar aktivatörü olarak daha düşük yüzey etken madde bulunduğu için "TC 6-TW 0,666; TC 5-TW 0,555; TC 4-TW 0,444; TC 3-TW 0,333; TC 2-TW 0,222; TC 6-SK 0,666; TC 5-SK 0,555; TC 4-SK 0,444; TC 3-SK 0,333" kodlu fomülasyonlar *in vitro* deriye penetrasyon çalışmaları için seçilmedi.
- Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat içeren ve küçük vezikül boyutu ve dağılımına sahip **"**TC 5-SK 1,25; TC 4-SK 1,33; TC 4-SK 1; TC 3-SK 1; TC 4-SK 0,705; 3-SK 0,529" kodlu takrolimus yüklü transetozomların vezikül boyutu ve dağılımları oldukça düşük olduğu için *in vitro* deriye penetrasyon çalışmalarında tercih edildi.

Yukardaki sebeplerden dolayı transetozom formülasyonlarından takrolimusun deriye penetrasyonu değerlendirmek için, vezikül boyutu ve dağılımı küçük olan ve 4 aylık fiziksel stabilite verileri dikkate alınarak; "TC 4- TW 1; TC 4- SK 1; TC 3-SK 1; TC 4- SK 1,33; TC 4-SK 0,705; TC 3-SK 0,529; TC 5-SK 1,25" kodlu formülasyonlar seçilmiştir. Seçilen takrolimus transetozom formülasyonların bileşenleri Tablo 53'te gösterilmiştir.

Tablo 4-53: Seçilen tacrolimus yüklü transetozom formülasyonları

Formülasyon kodu	Fosfolipit:Kenar Aktivatörü Oranı	Fospolipit (%)	Kenar Aktivatörü (%)	Hidrasyon Ortamı
TC 4- TW 1	(80:20)	4	Tween 80: 1	%30 Etanol / Su
TC 4-SK 1	(80:20)	4	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su
TC 3-SK 0,529	(85:15)	3	Sodyum Kolat: 0,529	%30 Etanol / Su
TC 4-SK 1,33	(75:25)	4	Sodyum Kolat: 1,33	%30 Etanol / Su
TC 3-SK 1	(75:25)	3	Sodyum Kolat: 1	%30 Etanol / Su
TC 4-SK 0,705	(85:15)	4	Sodyum Kolat: 0,705	%30 Etanol / Su
TC 5-SK 1,25	(80:20)	5	Sodyum Kolat: 1,25	%30 Etanol / Su

4.10. Kontrol Amaçlı Hazırlanan Tazaroten ve Takrolimus Yüklü Transferzom ve Etozom Formülasyonlarının Vezikül Boyutu, Polidispersite İndeksi ve Fiziksel Stabiliteleri Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Kontrol amaçlı hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarının vezikül boyutu ve polidispersite indeksi değerleri Tablo 4.54'te verilmiştir.

Tablo 4-54: Tazaroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonların vezikül boyutu ve dağılımı (n=3)

Formülasyon Kodu	Vezikül Boyutu (nm)	PDI
TZ TR	63,97 ± 2,070	0,348 ± 0,039
TZ ET	108,23 ± 2,081	0,448 ± 0,069
TC TR	83,37 ± 1,407	0,298 ± 0,006
TC ET	101,41 ± 1,719	0,397 ± 0,061

Kontrol amaçlı olarak hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü etozomlarda her iki ilaç için üç günde faz ayrımı izlendi, bu sonuç, hazırlanan etzomoların stabil olmadığını gösterir. Tazaroten ve takrolimus yüklü transferzomların fiziksel stabilitelerinin vezikül boyutu ve dağılmı açısından değerlendirilmesine ait sonuçlar Tablo 4.55'te verilmiştir.

Tablo 4-55: Tazaroten ve takrolimus yüklü transferzomların 5°C ± 3°C'de belirtilen bekletilmeleri sonrası vezikül boyutu ve dağılımları (n=3)

Kod	5°C ± 3°C'de Stabilite		
	Zaman	**Boyut (nm)**	**PDI**
TZ TR	0	63,97 ± 2,070	0,348 ± 0,039
	7 gün	67,68 ± 4,596	0,379 ± 0,018
	14 gün	67,43 ± 5,432	0,383 ± 0,013
	21 gün	69,42 ± 4,367	0,390 ± 0,017
TC TR	0	83,37 ± 1,407	0,298 ± 0,006
	1 ay	95,99 ± 1,495	0,405 ± 0,013
	2 ay	107,3 ± 1,553	0,453 ± 0,036
	3 ay	123,12 ± 1,242	0,498 ± 0,033
	4 ay	97,63 ± 5,230	0,542 ± 0,048

4.11. Seçilen Transetozom Formülasyonları ile Transferzom ve Etozom Formülasyonları Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.11.1. Zeta Potansiyel Bulguları

Seçilen tazaroten yüklü transetozm formülasyonları ile kontrol amaçlı hazırlanan tazaroten yüklü transferzom ve etozom formülasyonuna ait zeta potansiyel değerleri Tablo 4.56'da verilmiştir.

Tablo 4-56: Seçilen tazaroten yüklü transetozom, transferzom ve etozomun formülasyonlarına ait zeta potansiyel (mV) değerleri (n=3)

Formülasyon Kodu	Zeta Potansiyel (mV)
TZ 4- TW 1	-2,95 ± 0,269
TZ 3- TW 1	-2,91 ± 0,121
TZ 4-TW 1- 20	-3,13 ± 0,224
TZ 5- TW 1	-1,09 ± 1,549
TZ 4- SK 1	-11,55 ± 1,768
TZ 4-TW 0,5	-2,76 ±0,175
TZ 4- TW 1,33	-2,54 ± 0,400
TZ 6- SK 1	-7,27 ± 0,531
TZ TR	-1,93 ± 0,204
TZ ET	-2,51 ± 0,137

Seçilen takrolimus yüklü transetozm formülasyonları ve kontrol amaçlı hazırlanan takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonuna ait zeta potansiyel değerleri Tablo 4.57'de verilmiştir.

Tablo 4-57: Seçilen takrolimus yüklü transetozom, transferzom ve etozomun formülasyonlarına ait zeta potansiyel (mV) değerleri (n=3)

Formülasyon Kodu	Zeta Potansiyeli (mV)
TC 4- TW 1	-2,93 ± 0,431
TC 4-SK 1	-7,10 ± 0,442
TC 3-SK 0,529	-8,08 ± 0,640
TC 4-SK 1,33	-6,64 ± 0,467
TC 3-SK 1	-11,15 ± 0,636
TC 4-SK 0,705	-13,9 ± 1,120
TC 5-SK 1,25	-12,4 ± 0,058
TC TR	-51,25 ± 1,190
TC ET	-2,23 ± 0,396

4.11.2. Enkapsülasyon Verimi Bulguları

Yöntem 3.2.13.2'de anlatıldığı şekilde çalışılarak, tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyoları ile ve kontrol amaçlı hazırlanan transferzom ve etozom formülasyonlarına ait enkapsülasyon verimi bulguları Tablo 4.58 ve Tablo 4.59'de verilmiştir. Tazaroten yüklü formülasyonlar için ultrafiltrasyon yönteminde yüklenmeyen tazarotenin miktarı kullanılan yöntemin MTL değerinin altında kaldığı için, enkapsülasyon verimi için SD değerleri verilmemiştir.

Tablo 4-58: Tazaroten yüklü transetozom formülasyonları ile kontrol amaçlı hazırlanan transferzom ve etozom formülasyonlarının enkapsülasyon verimi bulguları (n=3)

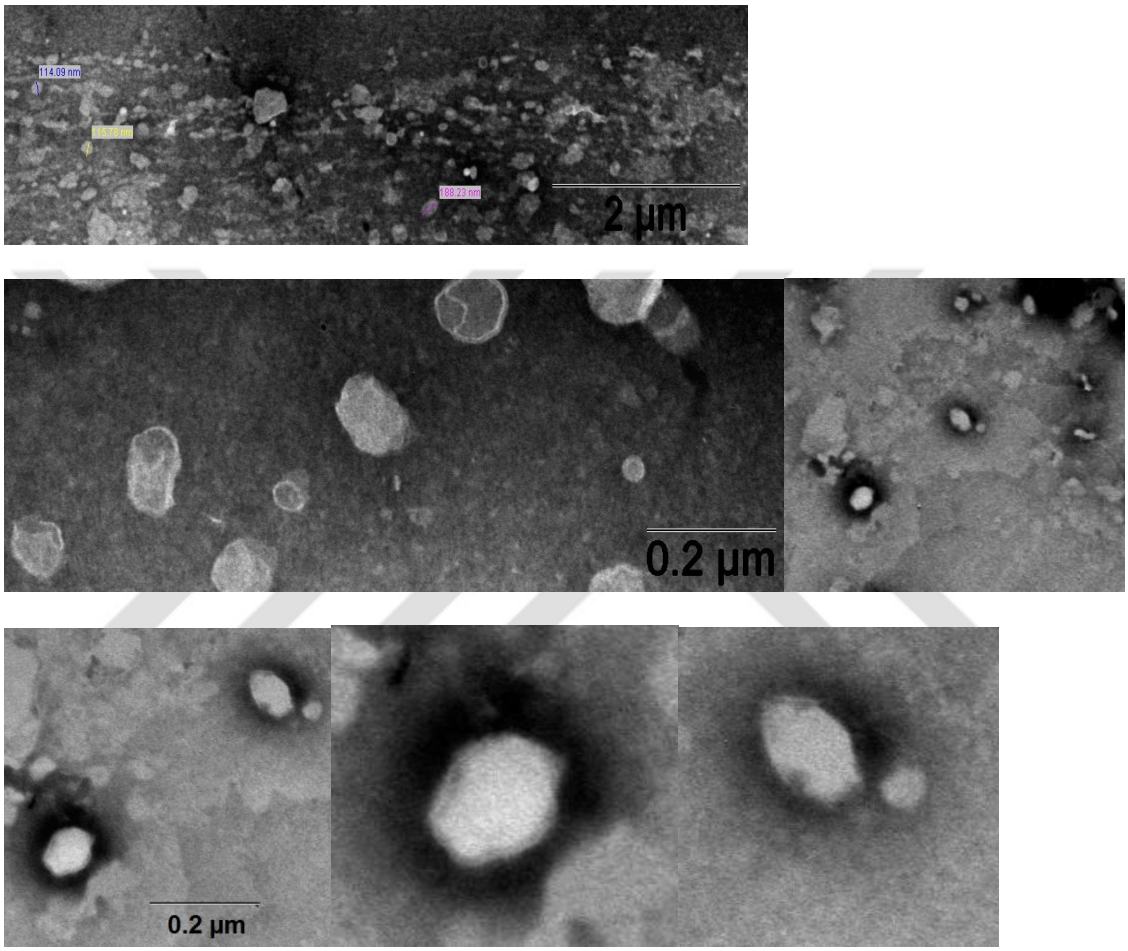
Formülasyon	Geri kazanım (%)	Ultrafiltrasyon Metodu (%)
TZ 4-TW 1	98,94 ± 2,47	99,96
TZ 3-TW 1	97,75 ± 2,09	99,96
TZ 4-TW 1- 20	94,52 ± 1,17	99,96
TZ 5-TW 1	98,24 ± 2,58	99,96
TZ 4-SK 1	98,94 ± 2,47	99,96
TZ 4-TW 0,5	95,39 ± 4,35	99,96
TZ 4- TW 1,33	92,07 ± 4,68	99,96
TZ 6- SK 1	101,85 ± 1,03	99,96
TZ TR	94,46 ± 5,32	99,96
TZ ET	95,87 ± 4,57	99,96

Tablo 4-59: Takrolimus yüklü transetozom formülasyonları ile kontrol amaçlı hazırlanan transferzom ve etozom formülasyonlarının enkapsülasyon verimi bulguları (n=3)

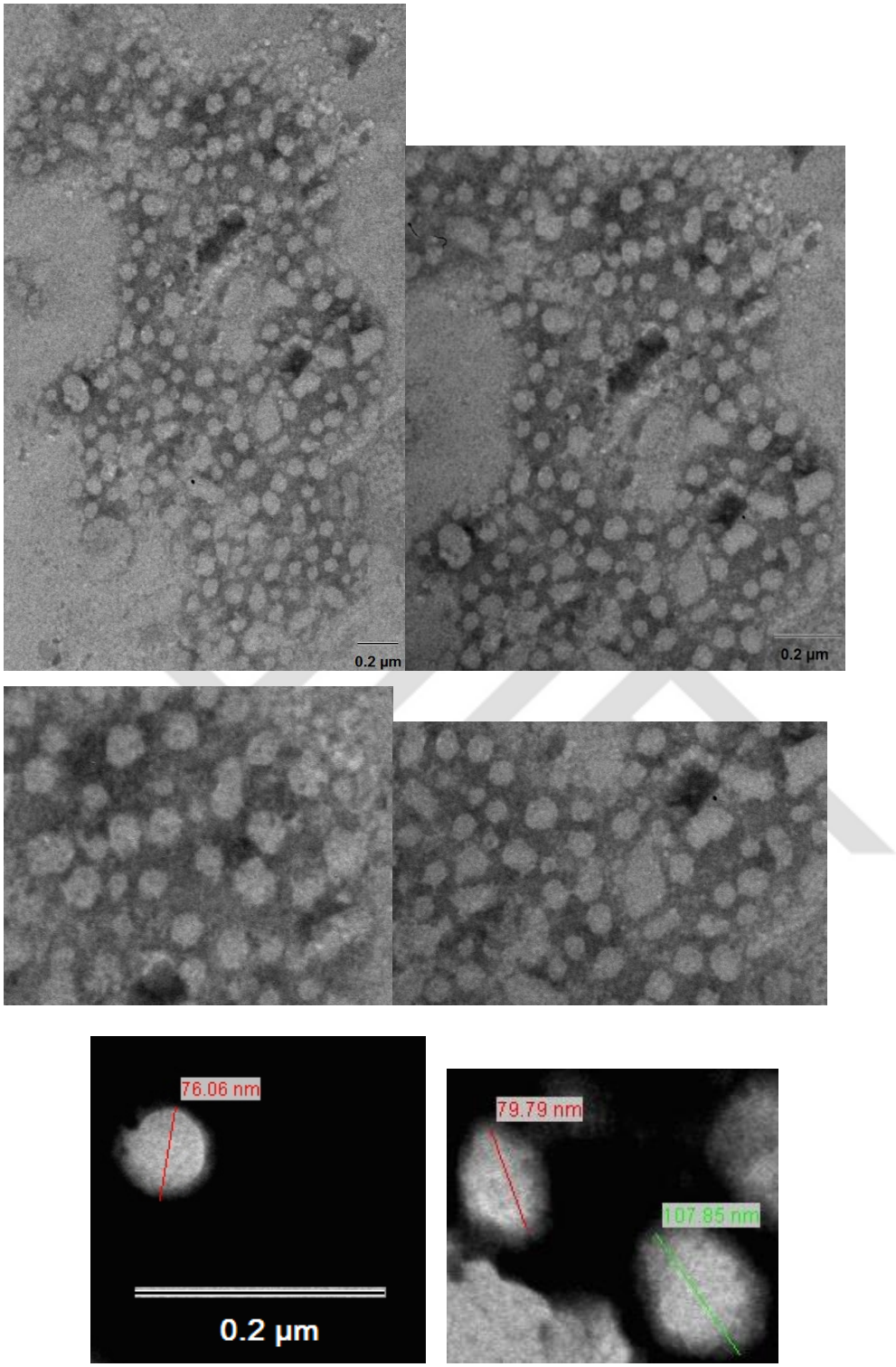
Formülasyon	Geri kazanım (%)	Ultrafiltrasyon Metodu (%)
TC 4-TW 1	100,54 ± 3,99	97,25 ± 2,19
TC 4-SK 1	97,97 ± 2,17	98,58 ± 0,19
TC 3-SK 0,529	95,49 ± 3,56	99,87 ± 0,05
TC 4-SK 1,33	96,98 ± 4,13	99,55 ± 0,17
TC 3-SK 1	95,55 ± 6,25	98,83 ± 0,25
TC 4-SK 0,705	96,60 ± 3,62	98,98 ± 0,47
TC 5-SK 1,25	95,99 ± 5,69	99,33 ± 0,23
TC TR	99,39 ± 5,99	99,59 ± 0,52
TC ET	97,26 ± 4,05	98,06 ± 0,90

4.11.3. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi

Yöntem 3.2.13.3 anlatıldığı şekilde yapılan TEM analizleri ile elde edilen TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu transetozomların görüntüleri Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



Şekil 4-14: TZ 4-TW 1 kodlu transetozoma ait TEM görüntüleri (Farklı büyütmeler ile alınan görüntüler)



Şekil 4-15: TC 4-SK 1 kodlu transetozoma ait TEM görüntüleri (Farklı büyütmeler ile alınan görüntüler)

4.12. Tazaroten ve Takrolimusun *In vitro* Koşullarda Deriye Penetrasyonlarının Bantla Soyma Yöntemi ile İncelenmesine ait Bulgular

Karakterizyon çalışmaları tamamlanmış tazaroten yüklü transetozomların (Tablo 4.43) *in vitro* deriye penetrasyon sonuçları Tablo 4.60'te verilmiştir.

Tablo 4-60: Tazaroten yüklü transetozom fomülasyonlarından tazarotenin deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3)

Formülasyon Kodu	Deri Tabakalarındaki Tazaroten Miktarı (µg)		±SD
TZ 4-TW 1	Üst SC	1,281	0,225
	Alt SC	0,228	0,074
	Canlı Epidermis+Dermis	3,615	0,804
TZ 3-TW 1	Üst SC	1,523	0,509
	Alt SC	0,720	0,279
	Canlı Epidermis+Dermis	1,937	0,149
TZ 4-TW 1-20	Üst SC	2,199	0,718
	Alt SC	0,508	0,130
	Canlı Epidermis+Dermis	1,930	0,093
TZ 5-TW 1	Üst SC	1,053	0,245
	Alt SC	0,242	0,082
	Canlı Epidermis+Dermis	1,736	0,303
TZ 4-SK 1	Üst SC	1,285	0,073
	Alt SC	0,398	0,124
	Canlı Epidermis+Dermis	1,708	0,092
TZ 4-TW 0,5	Üst SC	1,027	0,259
	Alt SC	0,218	0,014
	Canlı Epidermis+Dermis	1,344	0,391
TZ 4-TW 1,33	Üst SC	1,903	0,195
	Alt SC	0,333	0,074
	Canlı Epidermis+Dermis	1,187	0,158
TZ 6-SK 1	Üst SC	1,916	0,668
	Alt SC	0,286	0,089
	Canlı Epidermis+Dermis	1,106	0,122

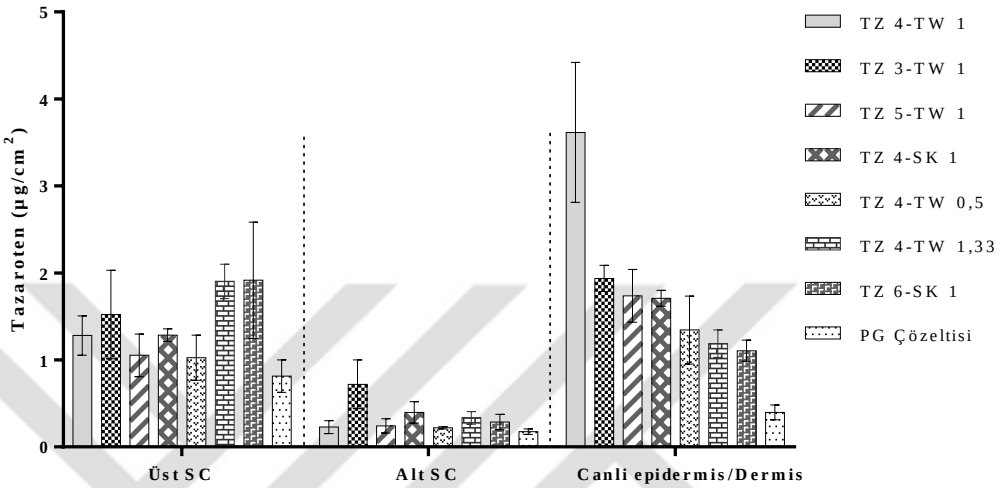
Tazaroten yüklü veziküler taşıyıcılar ve çözetilerin in vitro deriye penetrasyon çalışmasında; 24 saat sonunda reseptör faza geçen tazarotenin miktarı, MTL altında kaldığı için, etkin maddenin deri tabakalarında lokalize olarak sistemik dolaşıma geçişinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu saptanmıştır.

İn vitro penetrasyon çalışmalarında kontrol olarak; tazaroten yüklü transferzom (TZ TR), tazaroten yüklü etozom (TZ ET), tazarotenin propilen glikol (PG)'deki doymuş çözeltisi ve % 30'luk hidroetanolik doymuş çözeltisinden tazarotenin deriye penetrasyonuna ait sonuçlar Tablo 4.61'de verilmiştir.

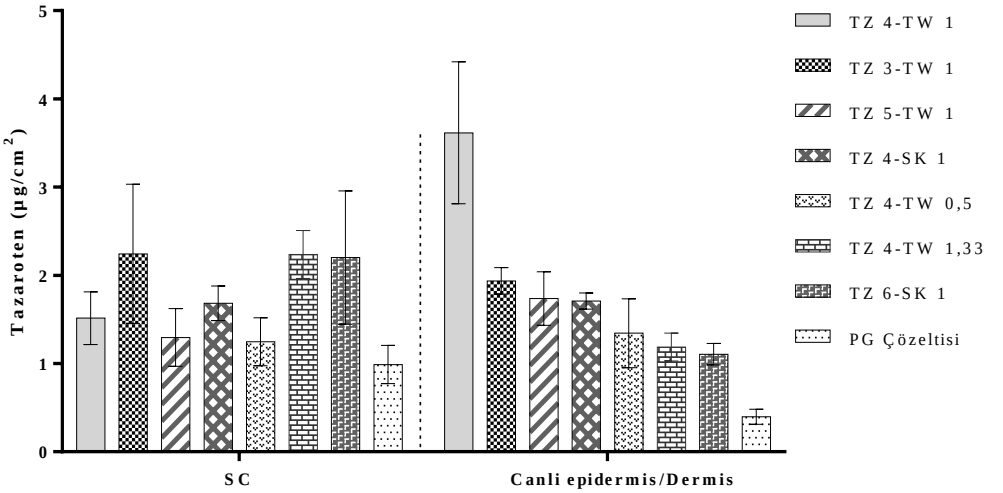
Tablo 4-61: Tazaroten yüklü kontrol formülasyonlarından/çözeltilerinden tazarotenin deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3)

Formülasyon Kodu	**Deri Tabakalarındaki Tazaroten Miktarı (µg)**		**±SD**
TZ TR	Üst SC	2,137	0,265
	Alt SC	0,254	0,046
	Canlı Epidermis+Dermis	0,950	0,293
TZ ET	Üst SC	0,723	0,152
	Alt SC	0,169	0,034
	Canlı Epidermis/Dermis	1,331	0,216
PG Çözeltisi	Üst SC	0,813	0,186
	Alt SC	0,176	0,031
	Canlı Epidermis+Dermis	0,398	0,086
Hidroetanolik Çözeltisi	Üst SC	0,140	0,027
	Alt SC	0,054	0,007
	Canlı Epidermis+Dermis	0,158	0,022

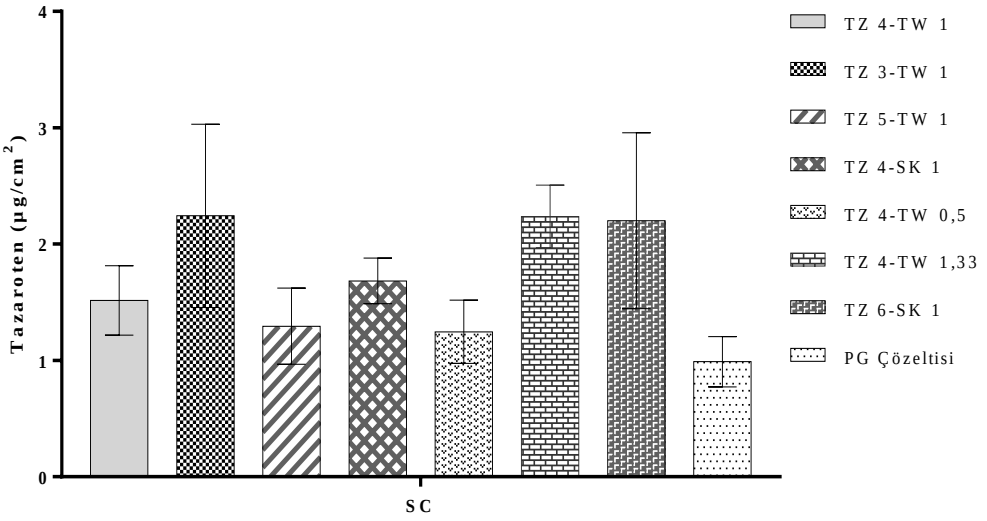
Tazaroten yüklü transetozomların ile kontrol olarak tazarotenin propilen glikol (PG)'deki doymuş çözeltisinden deriye penetrasyonunun karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4.16 - 4.19'de gösterilmiştir.



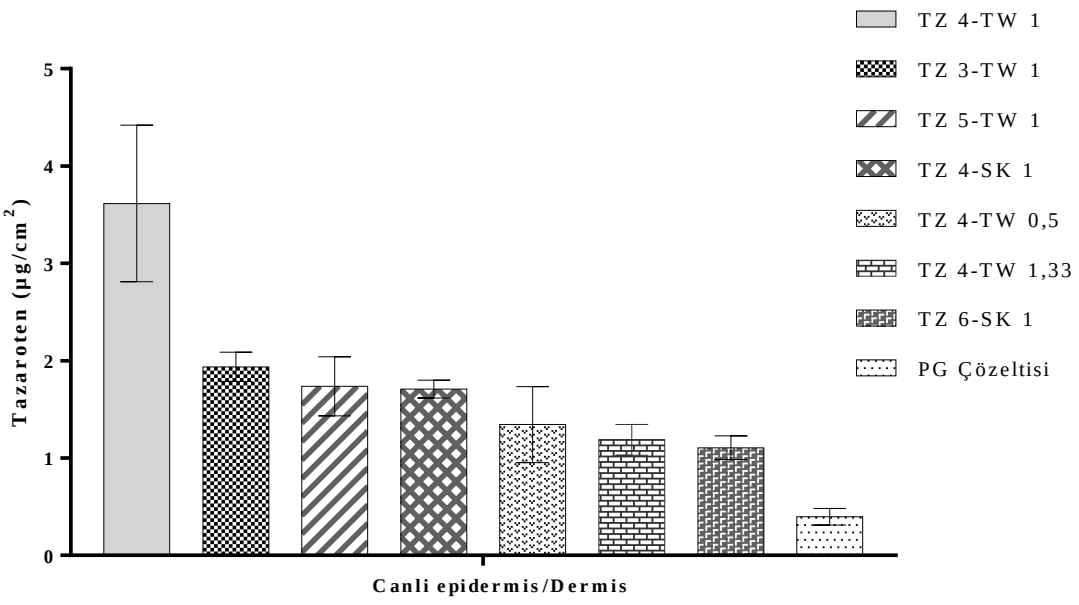
Şekil 4-16: Tazaroten yüklü transetozomları ile PG çözeltisinden tazarotenin alt ve üst *stratum corneum* ile canlı epidermis/dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik



Şekil 4-17: Tazaroten yüklü transetozomları ile PG çözeltisinden tazarotenin SC'daki (alt+üst *stratum corneum* toplam) ile canlı epidermis/dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik

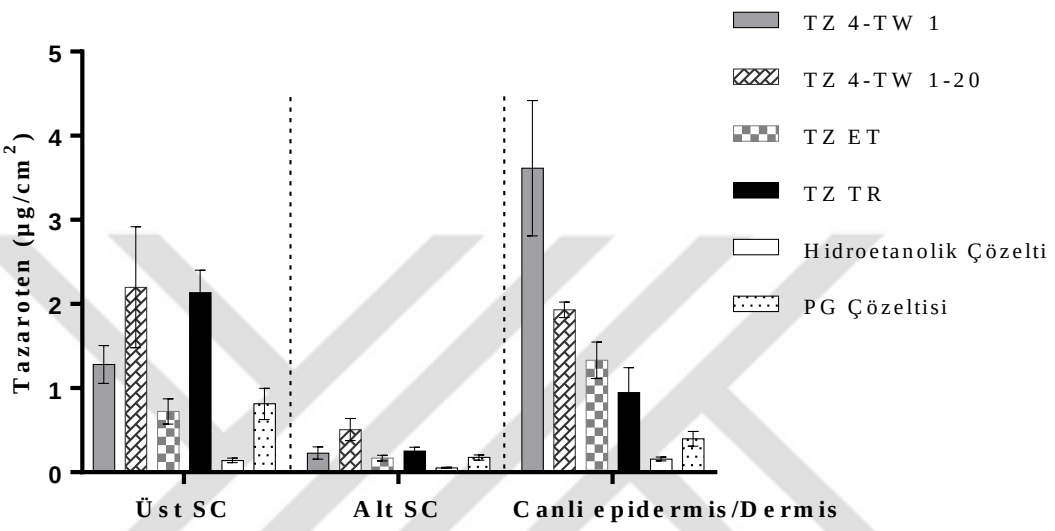


Şekil 4-18: Tazaroten yüklü transetozomlar ile PG çözeltisinden tazarotenin SC'daki (alt+üst *stratum corneum toplam*) birikiminin karşılaştırılması

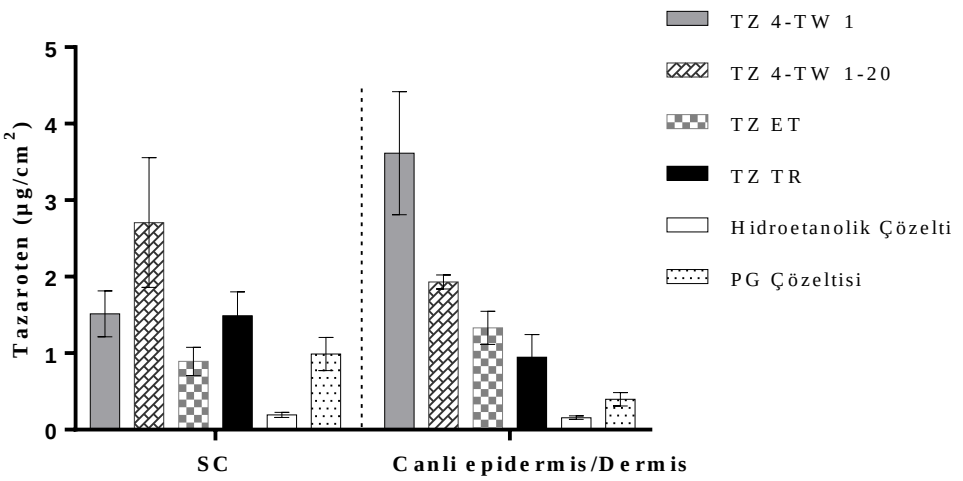


Şekil 4-19: Tazaroten yüklü transetozomları ile PG çözeltisinden tazarotenin canlı epidermis/ dermisteki birikiminin karşılaştırılması

Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer veziküler taşıyıcılar ile çözeltilerden in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı grafikler Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir.

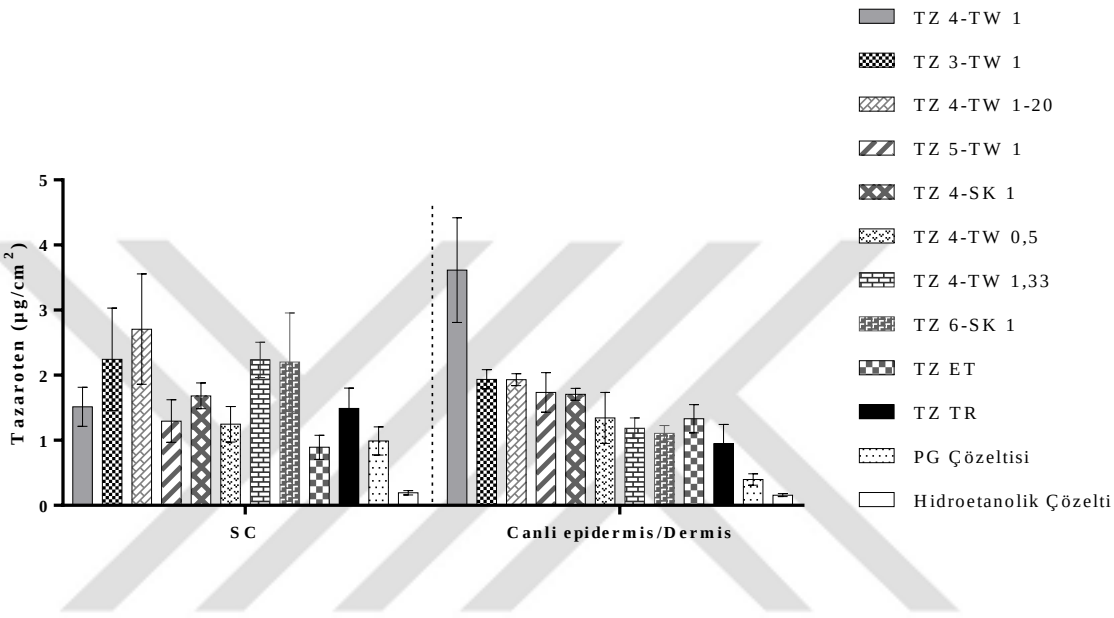


Şekil 4-20: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer veziküler taşıyıcılar ile çözeltilerden tazarotenin in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı grafik



Şekil 4-21: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer veziküler taşıyıcılar ile çözeltilerden tazarotenin SC'daki (alt+üst *stratum corneum* toplam) ile canlı epidermis/dermisdeki birikiminina ait karşılaştırmalı grafik

Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer tüm transetozom formülasyonları, transferzom ve etozom ile çözeltilerden tazarotenin in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı özetleyen grafik Şekil 4.22'de verilmiştir.



Şekil 4-22: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak diğer tüm transetozom formülasyonları, transferzom ve etozom ile çözeltilerden tazarotenin SC'daki (alt+üst *stratum corneum* toplam) ile canlı epidermis/dermisteki birikiminina ait özetleyen karşılaştırmalı grafik

Karakterizyon çalışmaları tamamlanmış takrolimus yüklü transetozomların (**TC 4- TW 1, TC 4- SK 1, TC 3-SK 1, TC 4- SK 1,33, TC 4-SK 0,705, TC 3-SK 0,529, TC 5-SK 1,25** kodlu transetozomlar) *in vitro* deriye penetrasyon sonuçları Tablo 4.62'de verilmiştir.

Takrolimus yüklü veziküler taşıyıcılar ve çözetilerin in vitro deriye penetrasyon çalışmasında; 24 saat sonunda reseptör faza geçen tazarotenin miktarı, MTL altında kaldığı için, etkin maddenin deri tabakalarında lokalize olarak sistemik dolaşıma geçişinin ihmal edilebilir düzeyde olduğu saptanmıştır.

Tablo 4-62: Takrolimus yüklü transetozom fomülasyonlarından takrolimusun deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3)

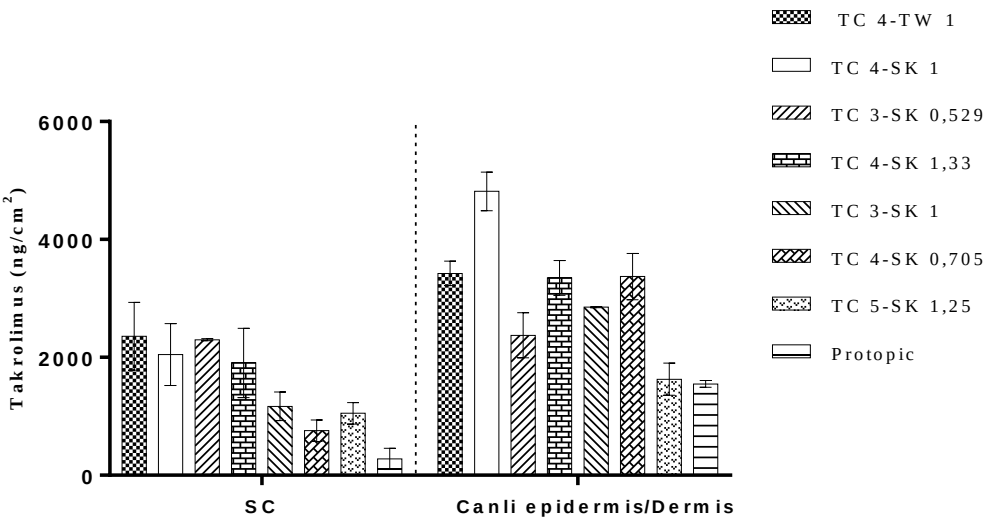
Formülasyon Kodu	Deri Tabakalarındaki Takrolimus Miktarı (ng)		±SD
TC 4-TW 1	SC	2358,8	575,1
	Canlı epidermis/Dermis	3424,4	207,1
TC 4-SK 1	SC	2048,8	525,1
	Canlı epidermis/Dermis	4816,3	328,3
TC 3-SK 0,529	SC	2299,4	18,8
	Canlı epidermis/Dermis	2374,3	382,4
TC 4-SK 1,33	SC	1950,3	589,7
	Canlı epidermis/Dermis	3345,8	294,7
TC 3-SK 1	SC	1169,9	244,5
	Canlı epidermis/Dermis	2851,9	10,1
TC 4-SK 0,705	SC	755,4	181,7
	Canlı epidermis/Dermis	3370,8	393,8
TC 5-SK 1,25	SC	1050,9	180,9
	Canlı epidermis/Dermis	1629,3	273,6

İn vitro penetrasyon çalışmalarında kontrol olarak; ticari preparat Protopic® %0.1, takrolimus yüklü transferzom (TC TR), takrolimus yüklü etozom (TC ET), takrolimusun %30'luk hidroetanolik doymuş çözeltisinden takrolimusun deriye penetrasyonuna ait sonuçlar Tablo 4.63'te verilmiştir.

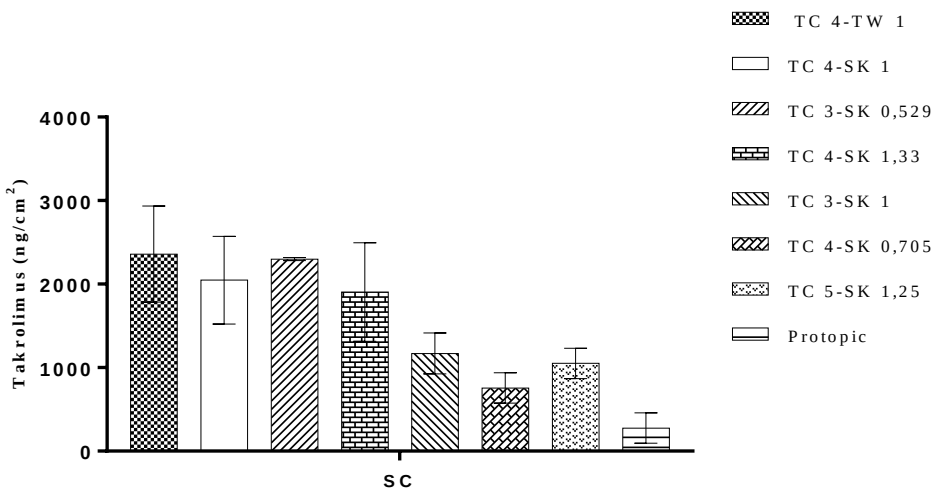
Tablo 4-63: Protopic ve takrolimus yüklü kontrol formülasyonlarından/çözeltilerinden takrolimusun deriye *in vitro* penetrasyonuna ait bulgular (n=3)

Kod	Deri Tabakalarındaki Takrolimus Miktarı (ng)		±SD
Protopic® %0,1	SC	276,5	181,4
	Canlı epidermis/Dermis	1550,0	56,0
TC TR	SC	460,9	17,7
	Canlı epidermis/Dermis	1739,0	153,2
TC ET	SC	1155,5	343,8
	Canlı epidermis/Dermis	2130,5	631,4
Hidroetanolik çözelti	SC	3957,3	132,6
	Canlı epidermis/Dermis	2822,2	3,6

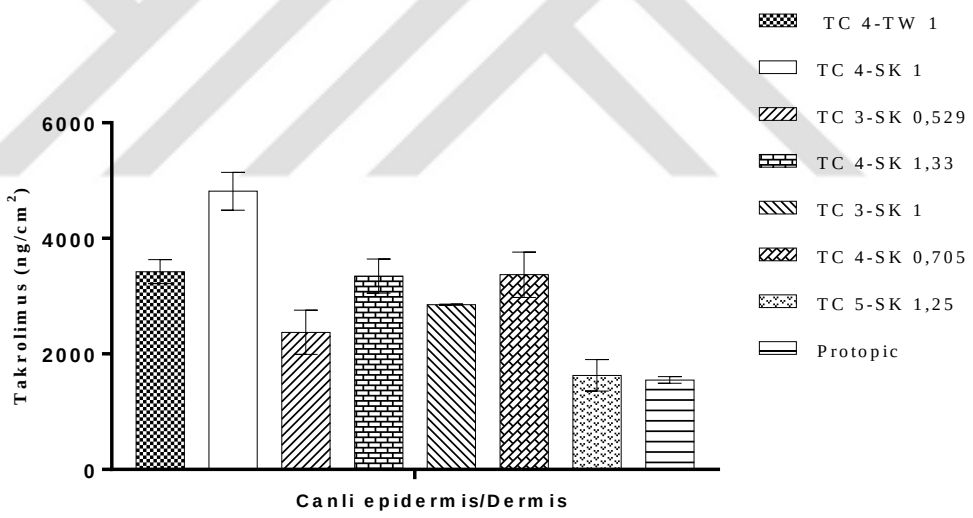
Takrolimus yüklü transetozomların ile kontrol olarak Protopic® %0,1 deriye penetrasyonunun karşılaştırmalı grafikleri Şekil 4.23 - 4.25'te gösterilmiştir.



Şekil 4-23: Takrolimus yüklü transetozomları ile Protopic®'ten takrolimusun SC'daki ile canlı epidermis/dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik

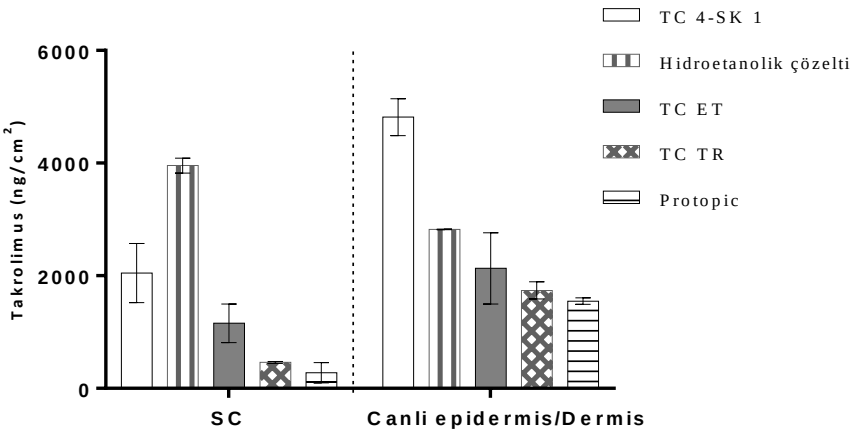


Şekil 4-24: Takrolimus yüklü transetozomları ile Protopic®'ten takrolimusun SC'daki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik



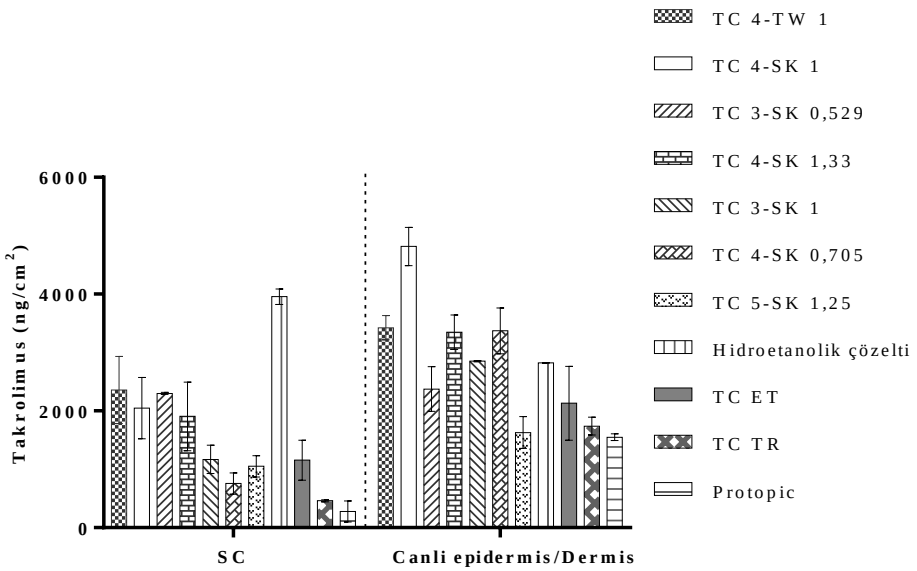
Şekil 4-25: Takrolimus yüklü transetozomları ile Protopic®'ten takrolimusun canlı epidermis/ dermisteki birikiminin karşılaştırılmasına ait grafik

Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak Protopic® ve diğer tüm transetozom formülasyonları, transferzom ve etozom ile hidroetanolik çözeltisinden takrolimusun in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı grafik Şekil 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4-26: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak Protopic® ve diğer veziküler taşıyıcılar ile hidroetanolik çözeltisinden takrolimusun in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı grafik

Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun Protopic® ve diğer transetozom transferzom, ve etozom formülasyonları ile hidroetanolik çözeltisinden takrolimusun domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı özetleyen grafik Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4-27: Canlı epidermis ve dermiste en yüksek birikim sağlayan takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun kontrol olarak Protopic® ve diğer tüm transetozom formülasyonları, transferzom ve etozom ile hidroetanolik çözeltisinden takrolimusun in vitro domuz derisinden penetrasyonuna ait karşılaştırmalı özetleyen grafik

4.13. ATR-FTIR Spektroskopisi

Yöntem 3.2.15 belirtildiği gibi ATR-FTIR Spektroskopisi ile çalışılarak, 24 saatlik in vitro deriye penetrasyon çalışması sonunda, tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyon bileşenlerinin derinin *startum corneum* tabakası üzerindeki etkisi, CH_2 asimetrik (2920 cm^{-1}) ve simetrik (2850 cm^{-1}) gerilme bantları üzerinde oluşturduğu değişiklikler olarak Tablo 4.64 ve Tablo 4.65'de gösterilmiştir.

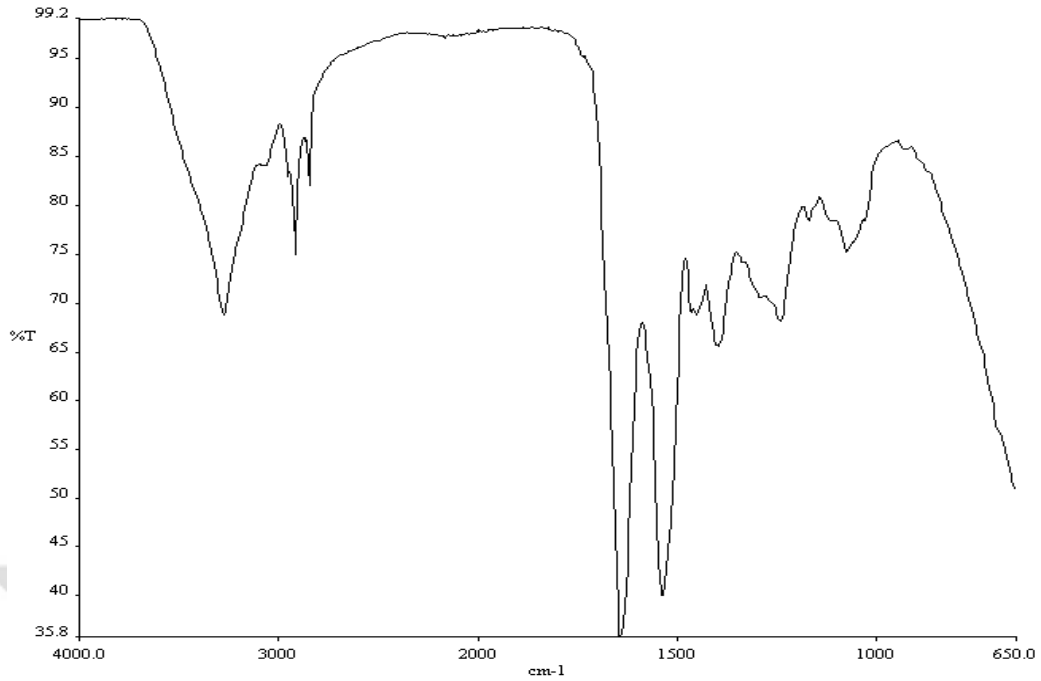
Tablo 4-64: Tazarotenin transetozom ve kontrol formülasyonları ve çözeltilerine ait ATR-FTIR analiz sonuçları (n=3)

	Asimetrik Gerilme (cm^{-1})	**Simetrik Gerilme (cm^{-1})**
Kontrol deri	2918,605 ± 0,092	2850,51 ± 0,057
TZ 4-TW 1	2922,973 ± 0,717	2852,840 ± 0,170
TZ 3-TW 1	2922,555 ± 0,205	2852,215 ± 0,078
TZ 4-TW 1-20	2921,715 ± 0,375	2852,220 ± 0.255
TZ 5-TW 1	2919,887 ± 1,036	2851,217 ± 0,387
TZ 4-SK 1	2921,895 ± 0,375	2852,225 ± 0,177
TZ 4-TW 0,5	2921,545 ± 0,467	2852,113 ± 0,342
TZ 4-TW 1,33	2922,410 ± 0,226	2852,465 ± 0,247
TZ 6-SK 1	2920,237 ± 1,279	2851,373 ± 0,465
TZ TR	2921,607 ± 0,533	2852,137 ± 0,440
TZ ET	2920,700 ± 0,226	2851,515 ± 0,148
PG Çözeltisi	2922,120 ± 0,118	2852,727 ± 0,078
Hidroetanolik Çözelti	2921,140 ± 0,234	2851,660 ± 0,319

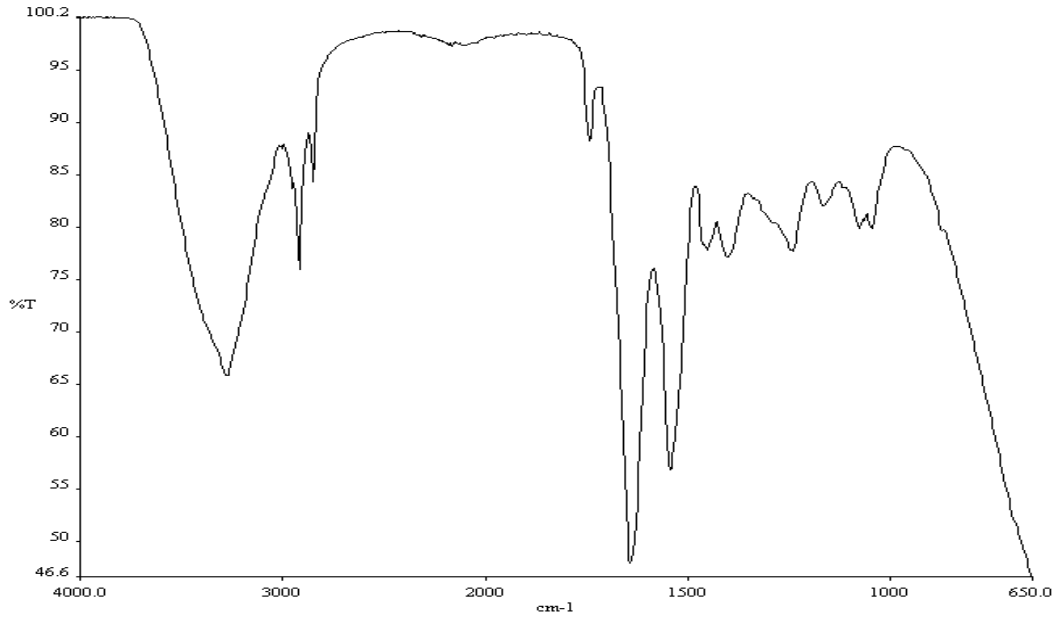
Tablo 4-65: Takrolimusun transetozom ve kontrol formülasyonları ve çözeltilerine ait ATR-FTIR analiz sonuçları (n=3)

	Asimetrik Gerilme (cm^{-1})	Simetrik Gerilme (cm^{-1})
Kontrol deri	2918,605 ± 0,092	2850,510 ± 0,057
TC 4-TW 1	2922,271 ± 0,102	2852,151 ± 0,190
TC 4-SK 1	2922,675 ± 0,049	2852,480 ± 0,553
TC 3-SK 0,529	2921,710 ± 0,561	2851,890 ± 0,245
TC 4-SK 1,33	2922,535 ± 0,563	2852,340 ± 0,465
TC 3-SK 1	2922,357 ± 0,132	2851,861 ± 0,372
TC 4-SK 0,705	2921,492 ± 0,269	2852,105 ± 0,573
TC 5-SK 1,25	2921,581 ± 0,085	2851,655 ± 0,035
Protopic	2919,465 ± 0,235	2850,793 ± 0,179
TC TR	2921,860 ± 0,430	2851,957 ± 0,085
TC ET	2922,161 ± 0,425	2852,152 ± 0,272
Hidroetanolik Çözelti	2921,763 ± 0,567	2852,005 ± 0,247

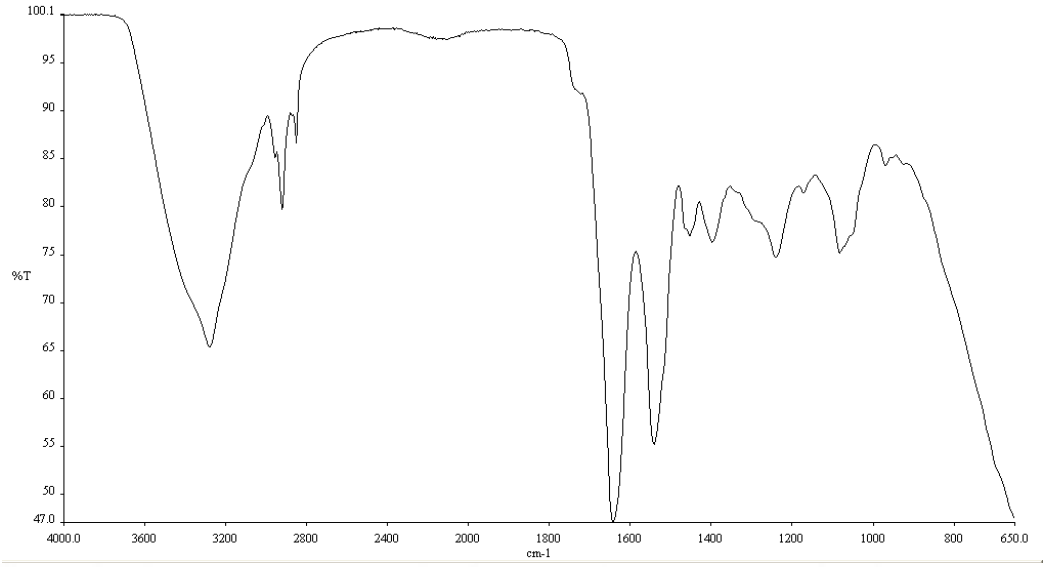
Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol deri örneğinin ATR-FTIR spektrumu Şekil 4.28'de gösterildi. Tazaroten yüklü transetozom ve kontrol formülasyonları/çözeltilerinin uygulanmasının 24 saattan sonra deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumları sırası ile Şekil 4.29 ile Şekil 4.40 aralığında verildi. Takrolimus yüklü transetozom ve kontrol formülasyonlarının uygulanmasının 24 saattan sonra deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumları sırası ile Şekil 4.41 ile Şekil 4.51 aralığında verildi. Ayrıca Tazaroten ve akrolimus için asemetrik ve simetrik gerilme bantların gösteren karşılaştırmalı grafik şekil 4.52 ve Şekil 4.53'te tazaroten için ve şekil 4.54 ve Şekil 4.55'te takromlimus için verildi.



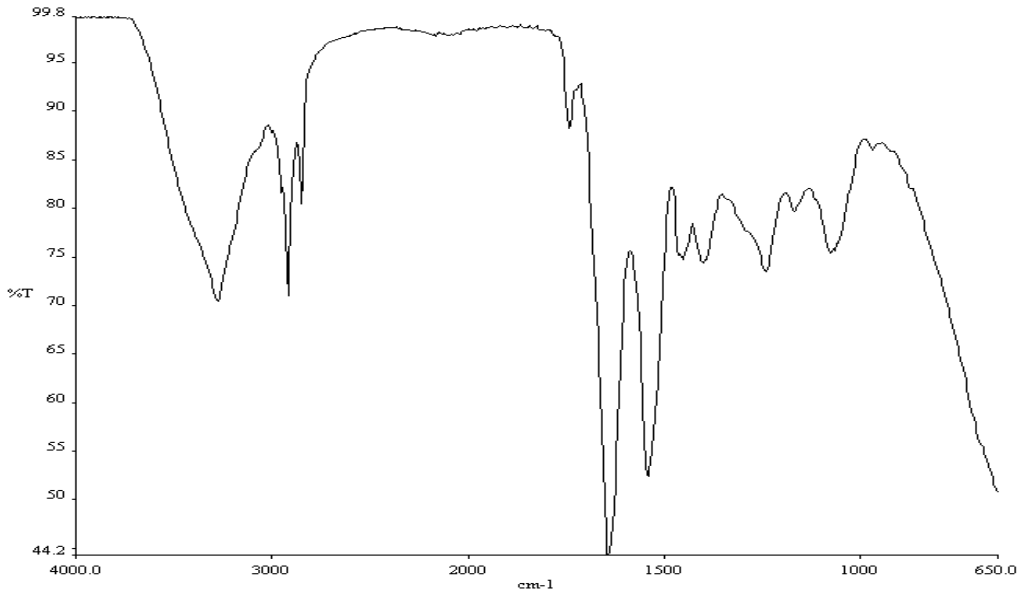
Şekil 4-28: Kontrol deriye ait (formülasyon uygulaması yapılmamış olan) ATR-FTIR spektrumu



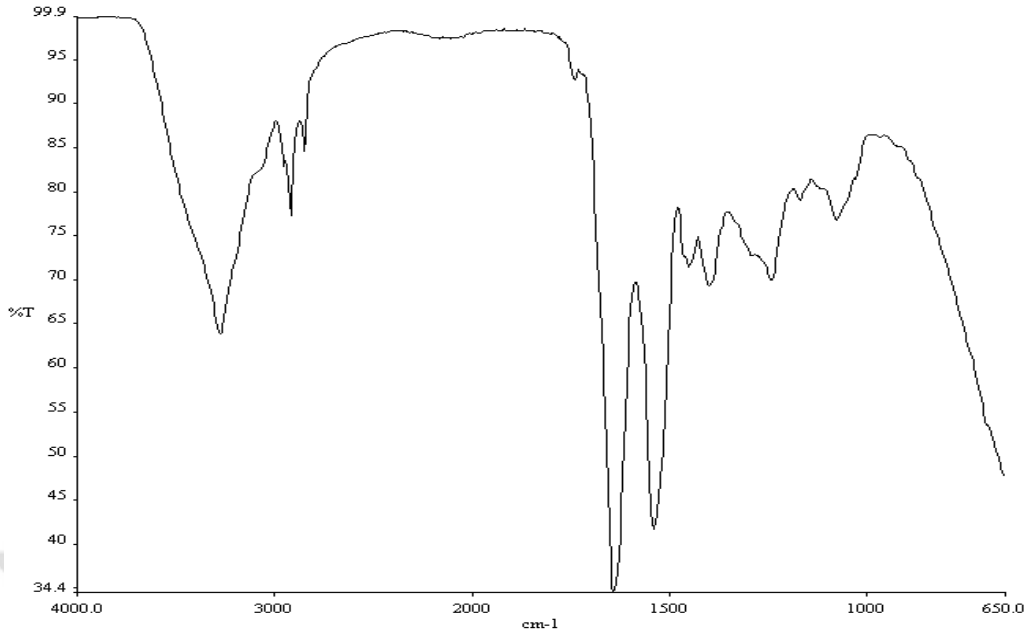
Şekil 4-29: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



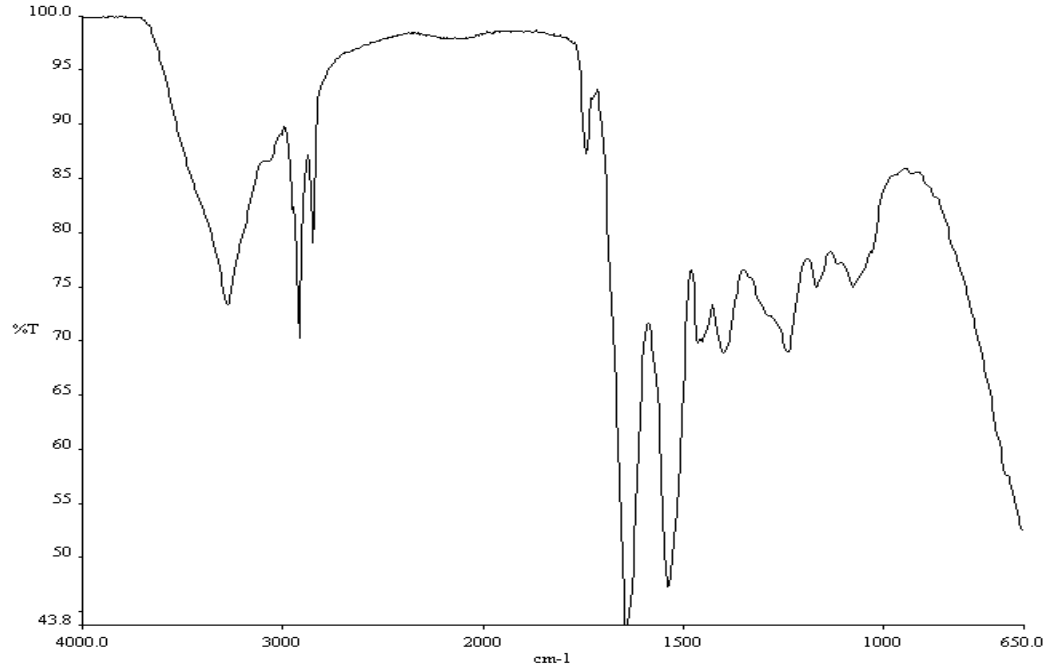
Şekil 4-30: Tazaroten yüklü TZ 3-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



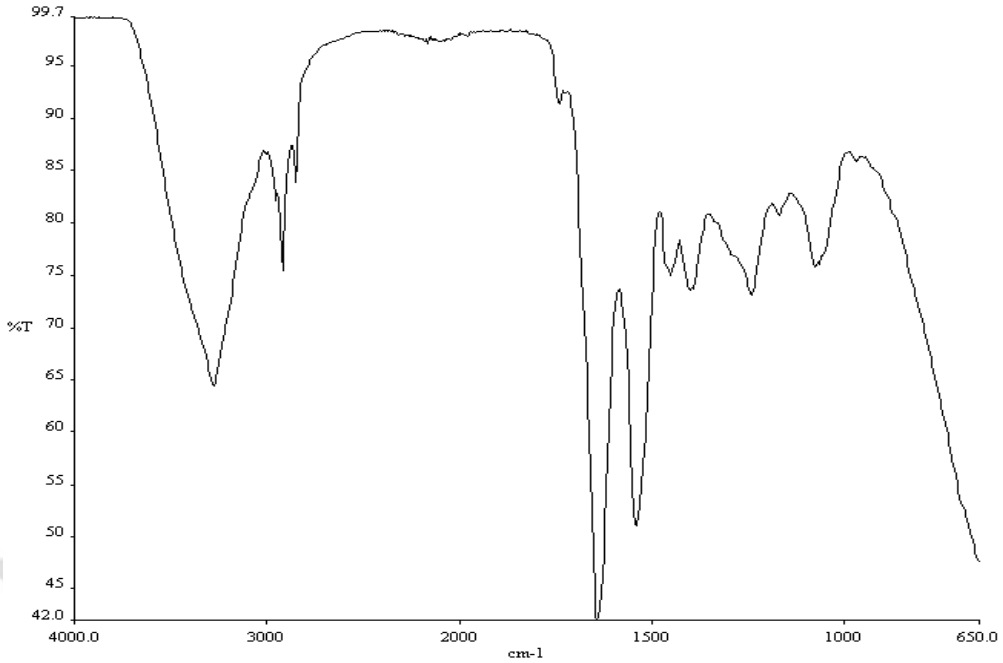
Şekil 4-31: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1-20 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



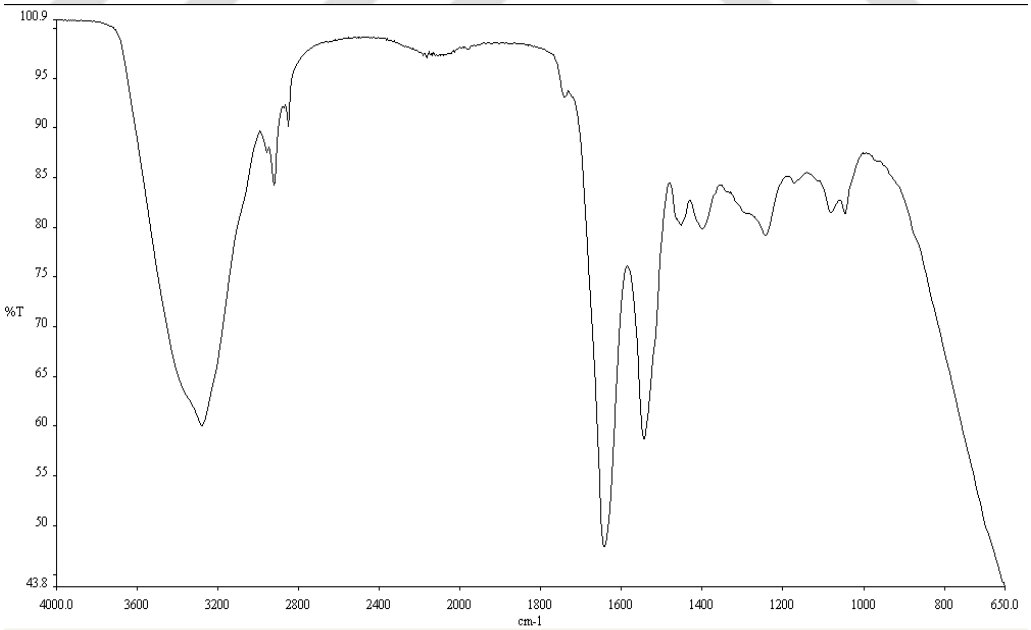
Şekil 4-32: Tazaroten yüklü TZ 5-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



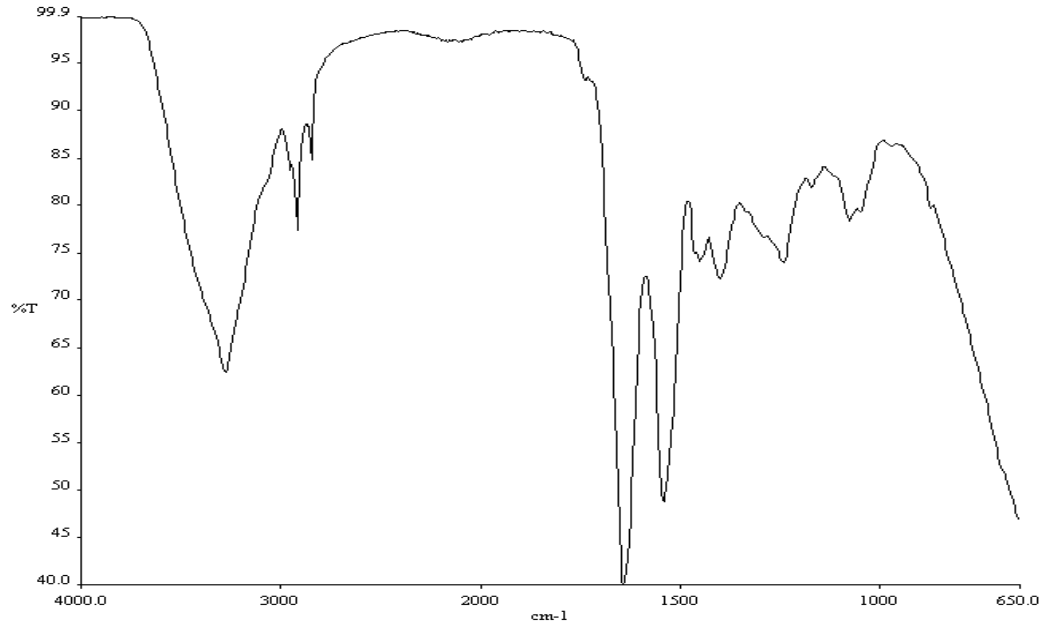
Şekil 4-33: Tazaroten yüklü TZ 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



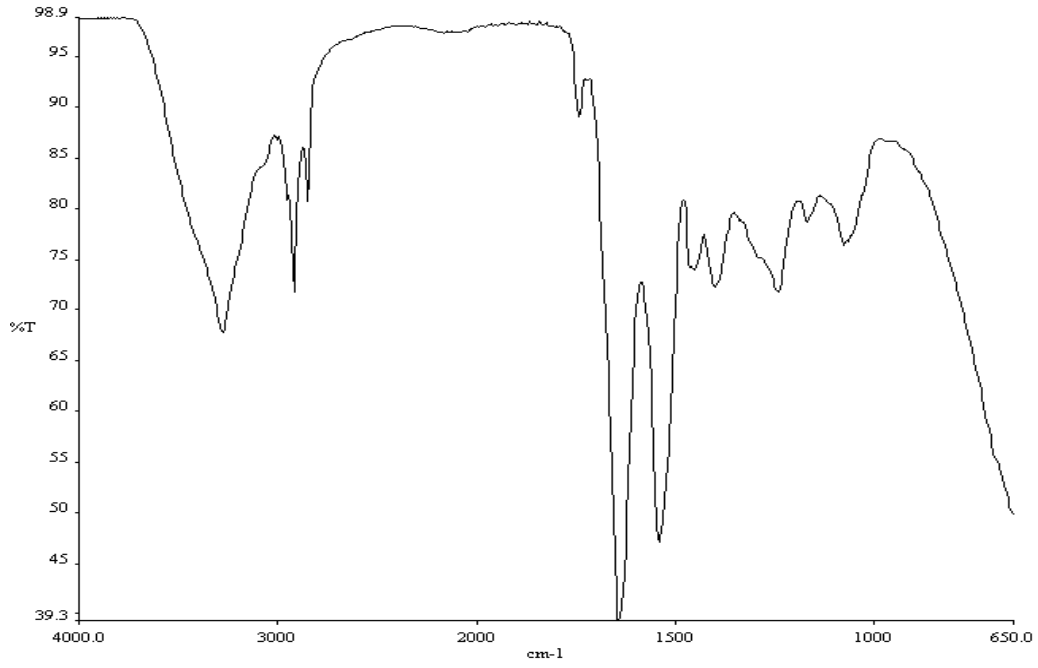
Şekil 4-34: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 0,5 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



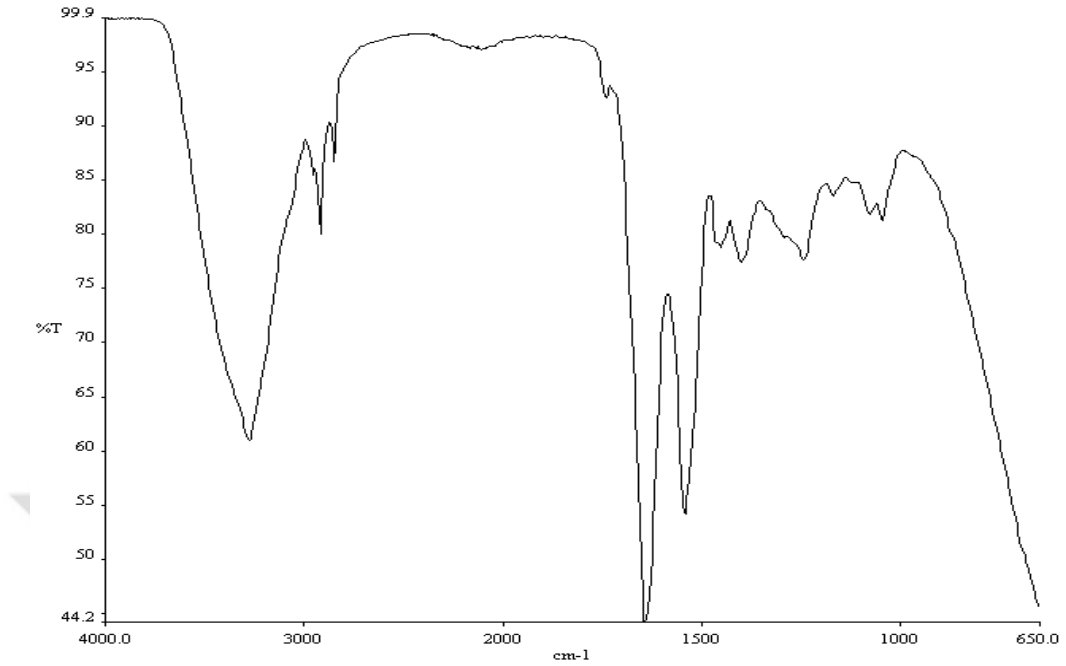
Şekil 4-35: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1,33 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



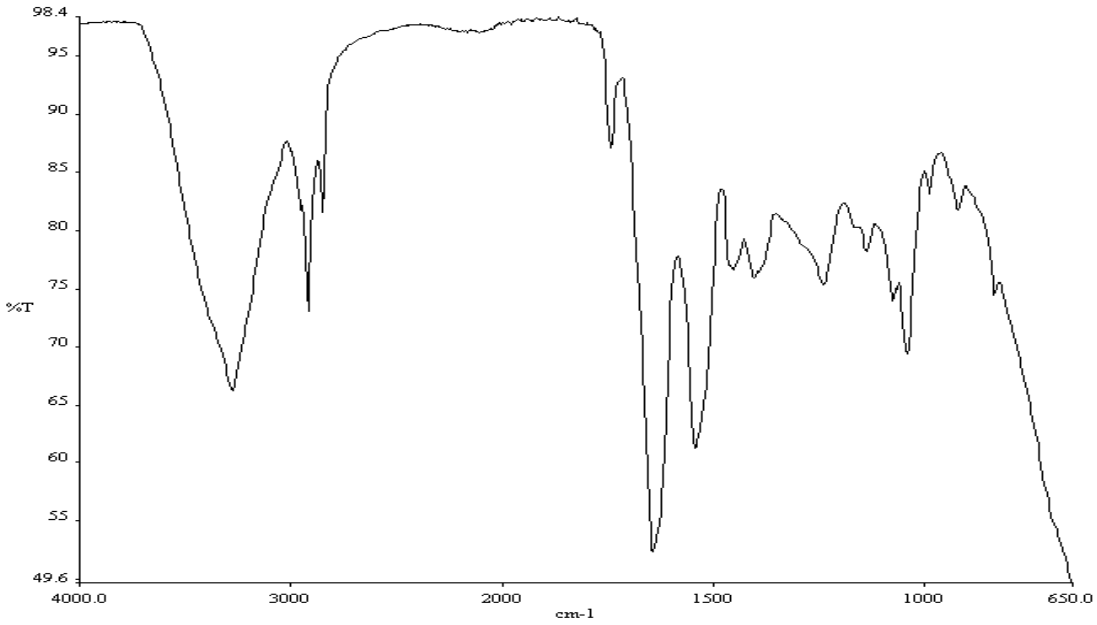
Şekil 4-36: Tazaroten yüklü TZ 6-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



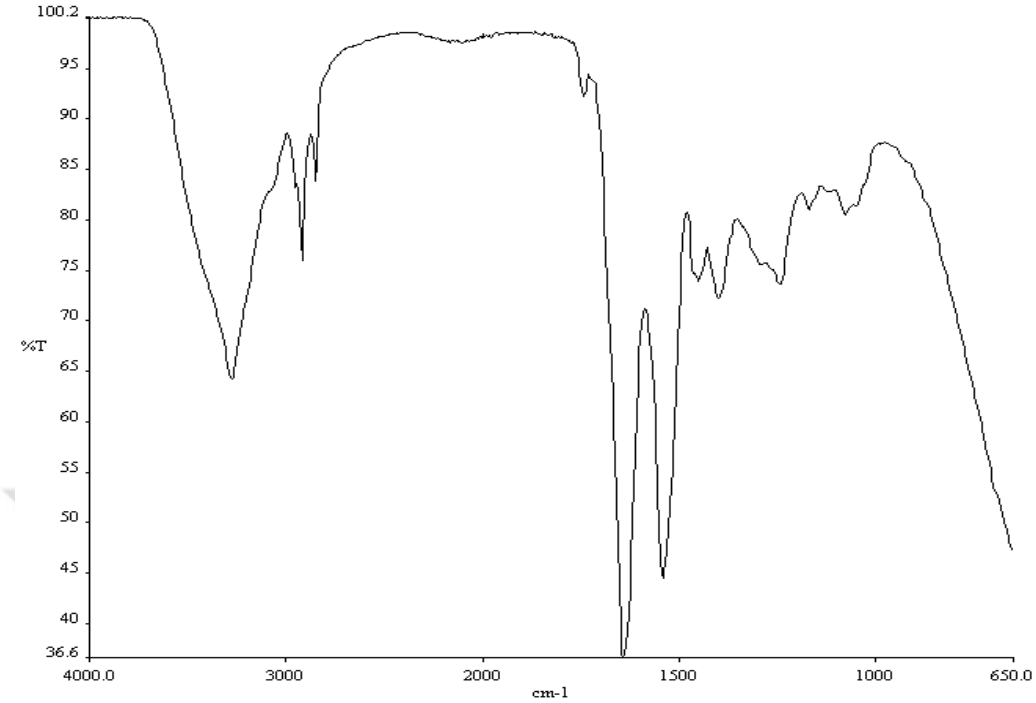
Şekil 4-37: Tazaroten yüklü TZ TR kodlu transeferzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



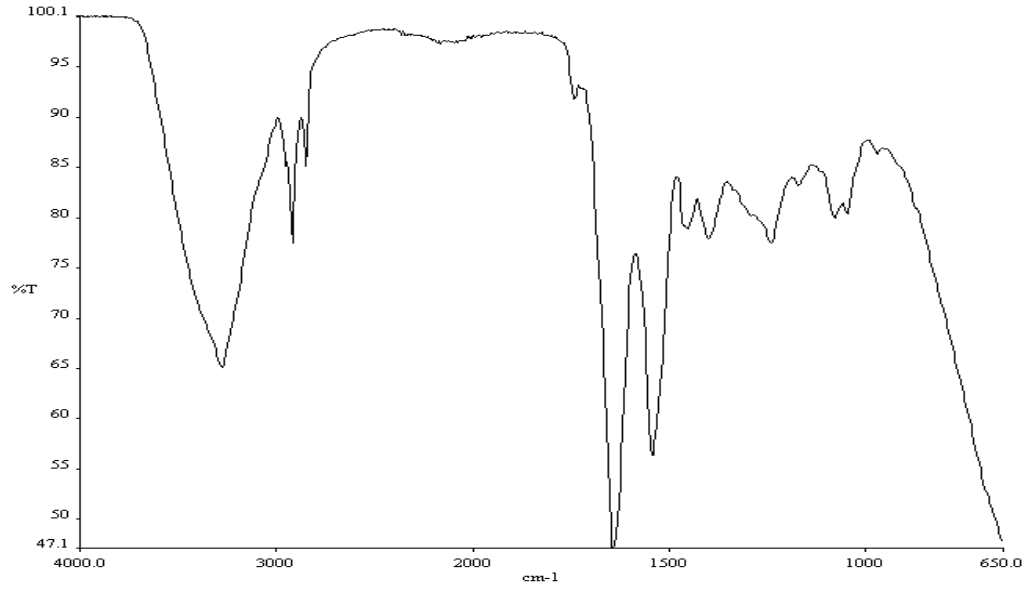
Şekil 4-38: Tazaroten yüklü TZ ET kodlu etozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



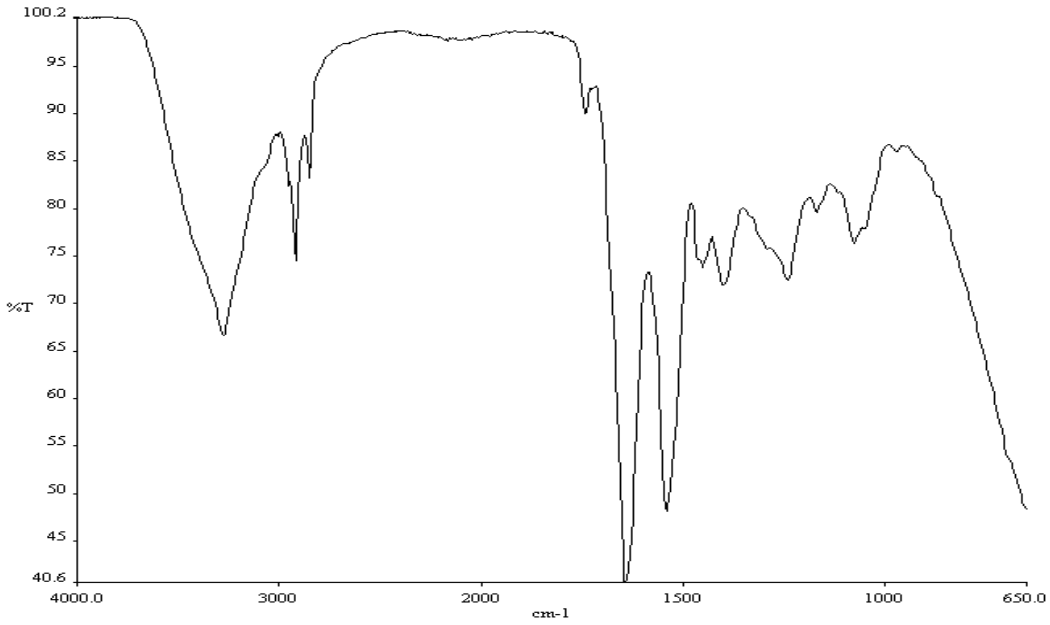
Şekil 4-39: Tazarotenin PG doymuş çözeltinin uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



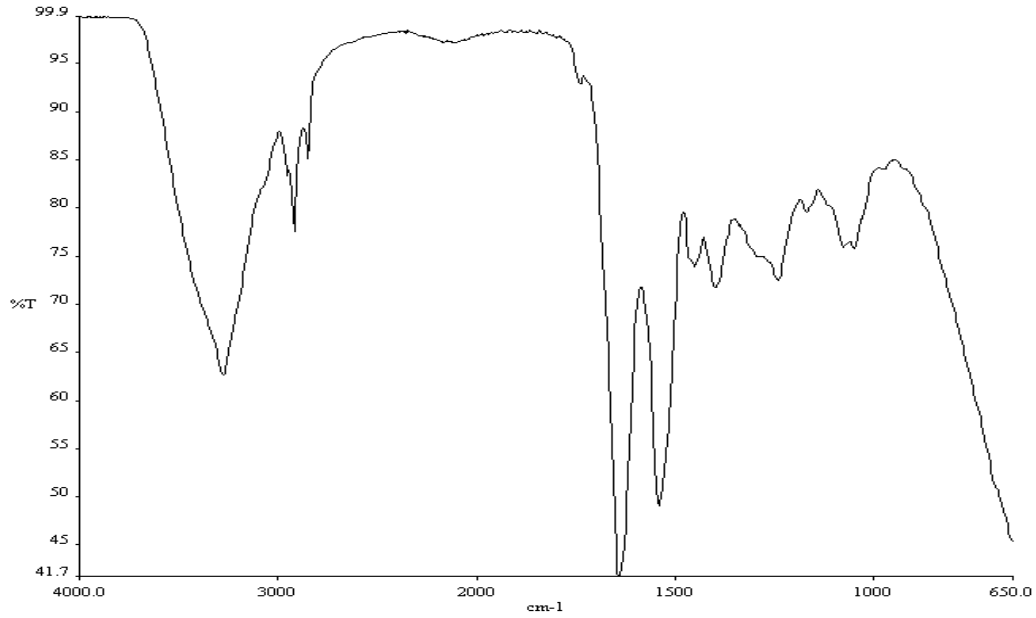
Şekil 4-40: Tazarotenin hidroetanolik doymuş çözeltinin uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



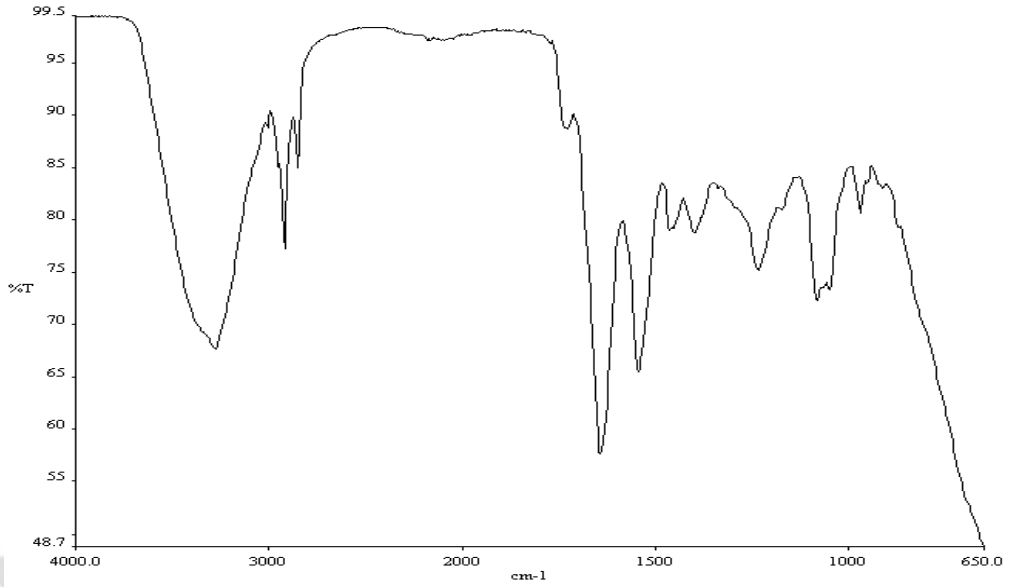
Şekil 4-41: Takrolimus yüklü TC 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



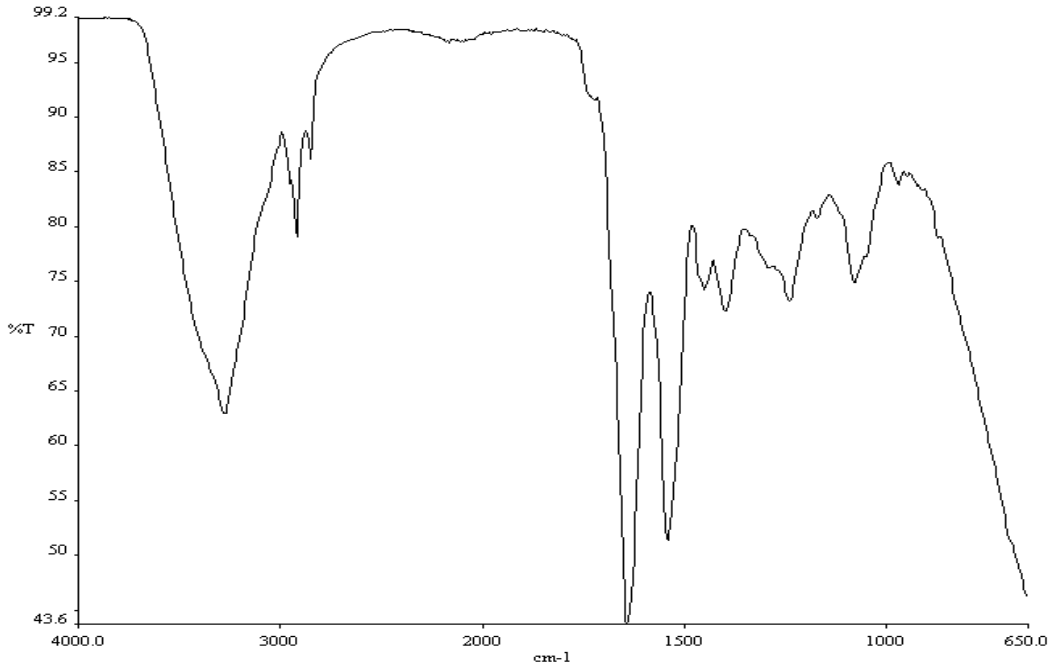
Şekil 4-42: Takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



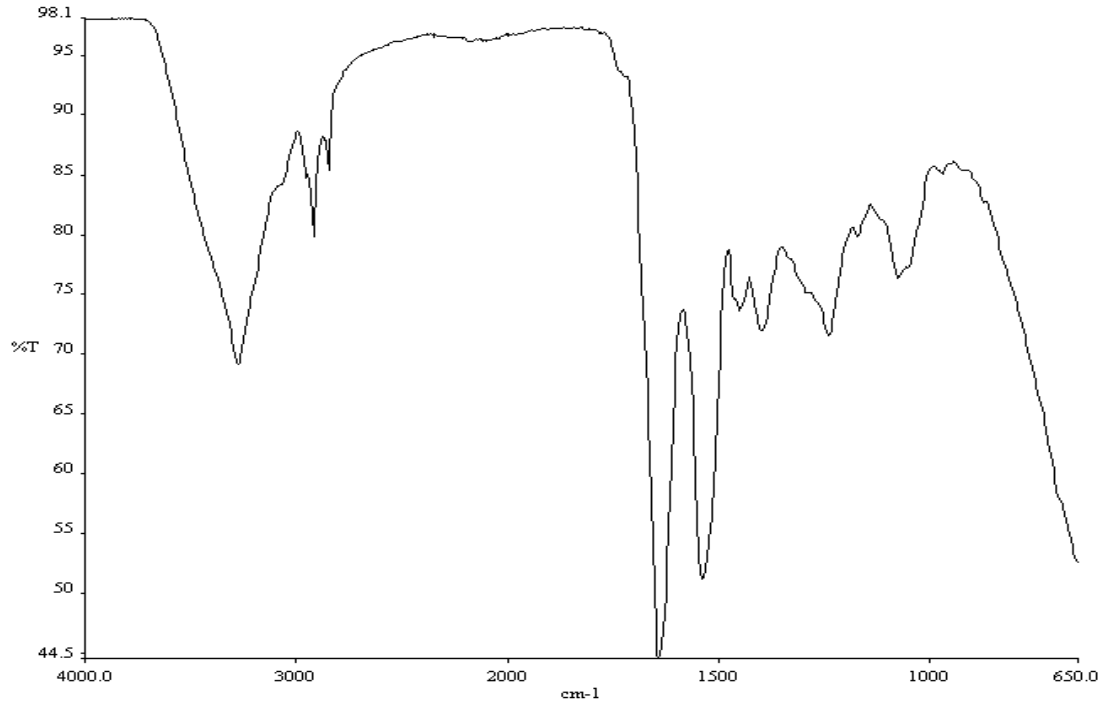
Şekil 4-43: Takrolimus yüklü TC 3-SK 0,529 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



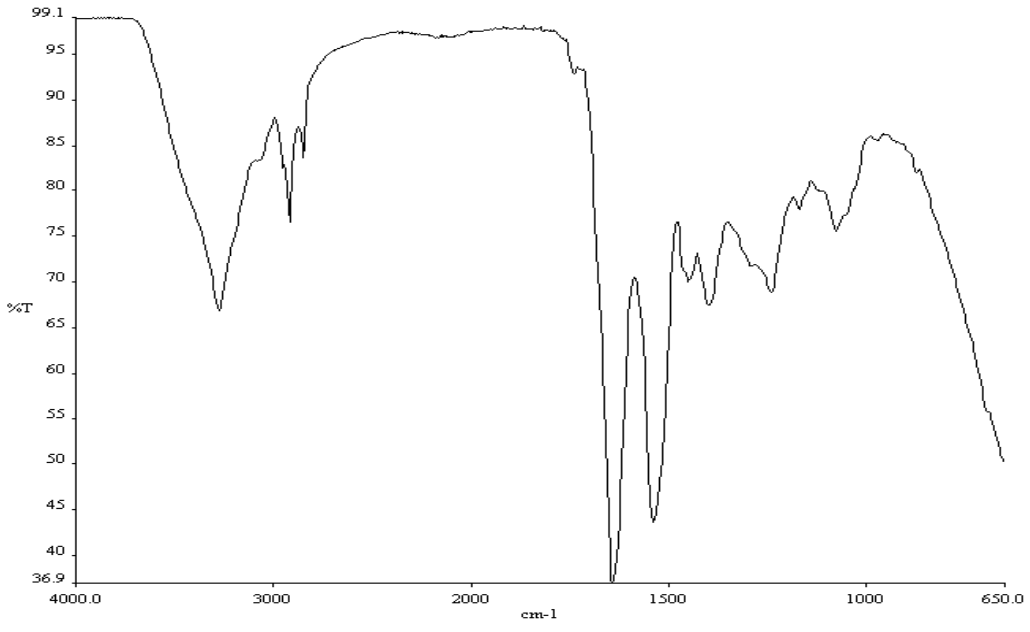
Şekil 4-44: Takrolimus yüklü TC 4-SK 1,33 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



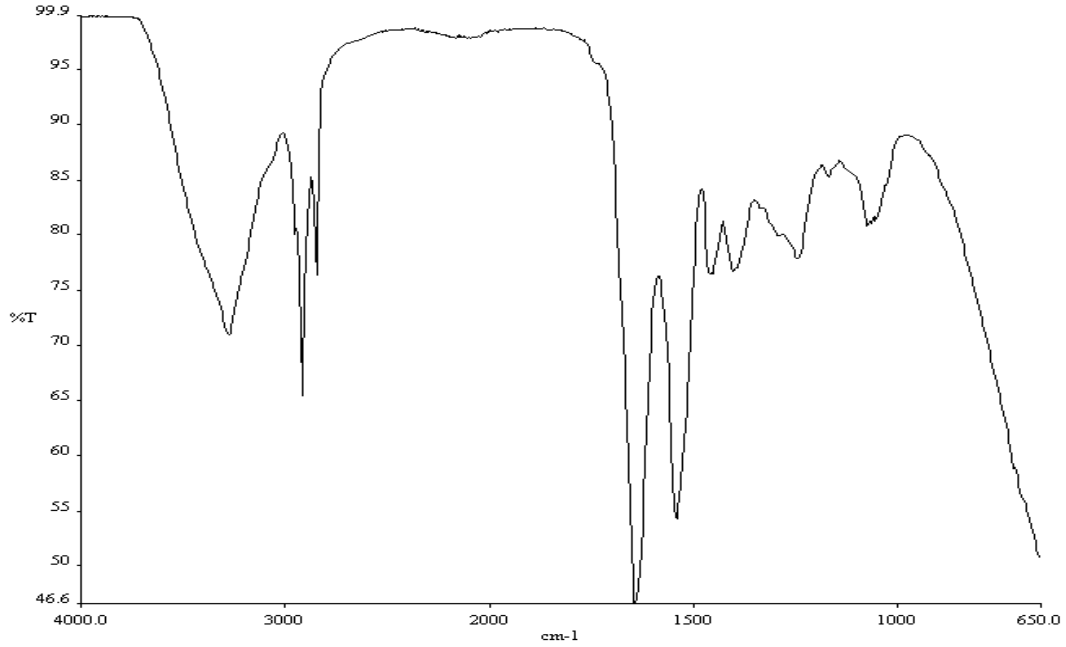
Şekil 4-45: Takrolimus yüklü TC 3-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



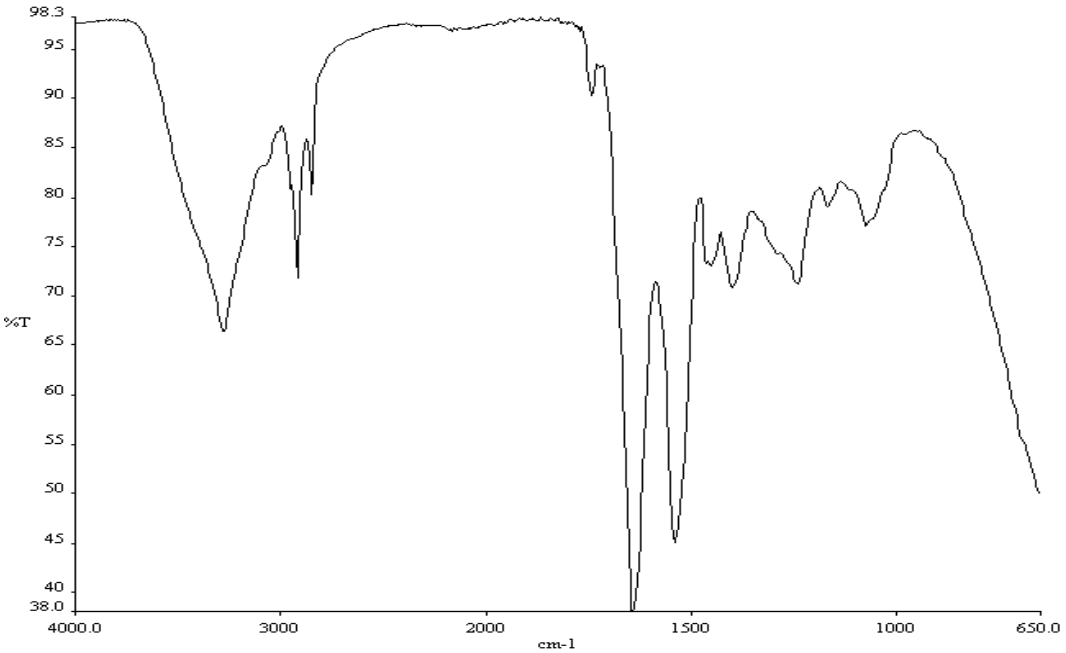
Şekil 4-46: Takrolimus yüklü TC 4-SK 0,705 kodlu transetzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



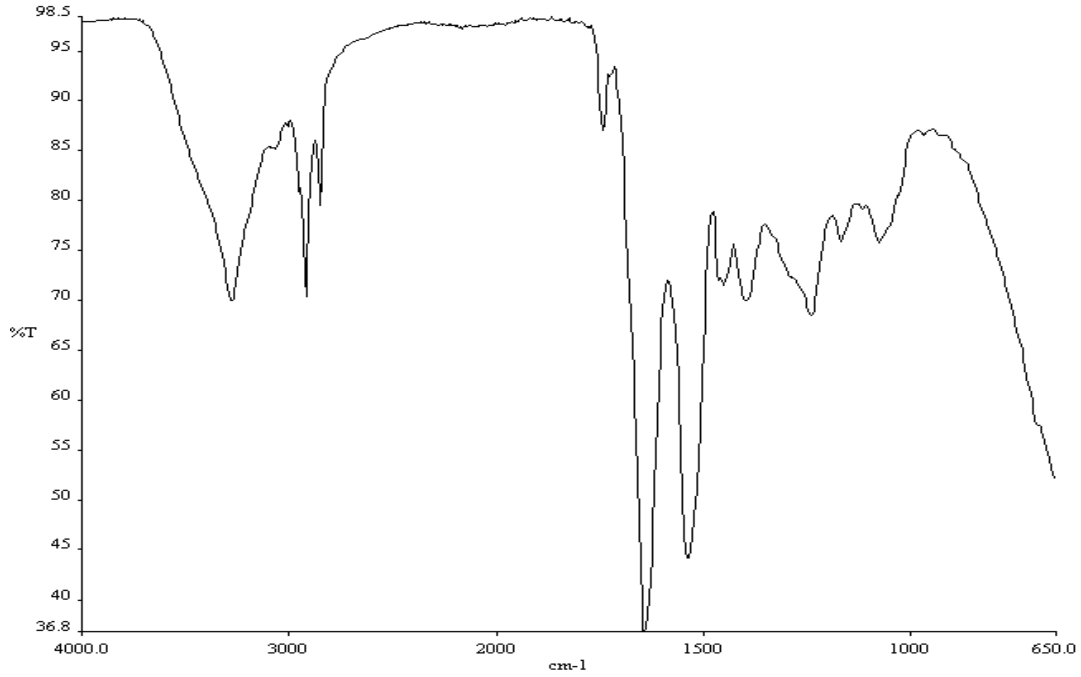
Şekil 4-47: Takrolimus yüklü TC 5-SK 1,25 kodlu transeferzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



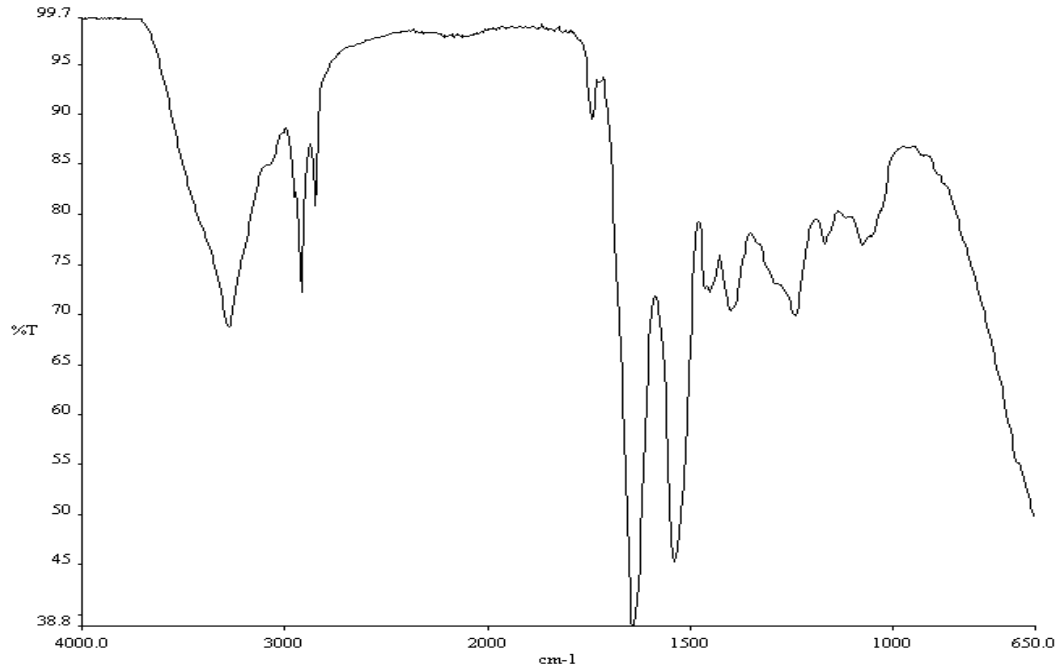
Şekil 4-48: Takrolimusun konvansiyonel (Protopic®) formülasyonun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



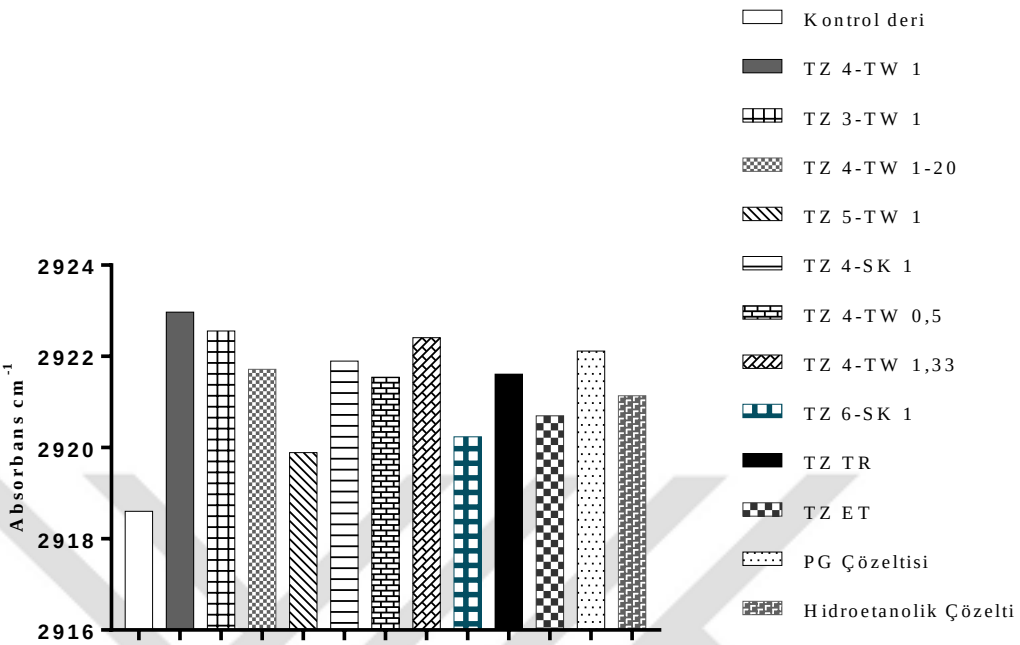
Şekil 4-49: Takrolimus yüklü TC TR kodlu transferzom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



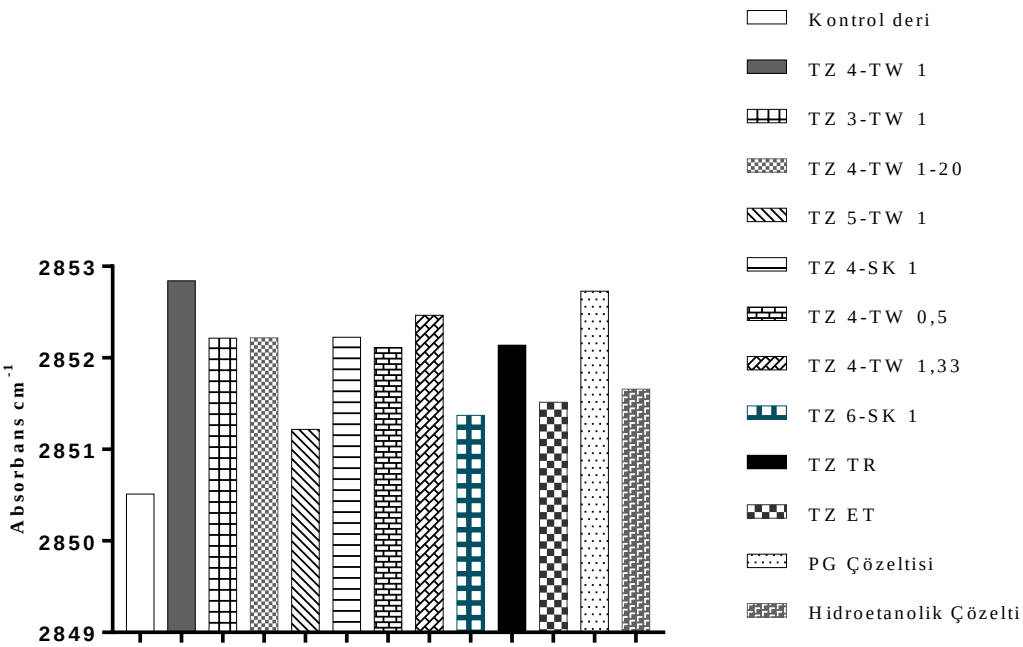
Şekil 4-50: Takrolimus yüklü TC ET kodlu etozom formülasyonunun uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



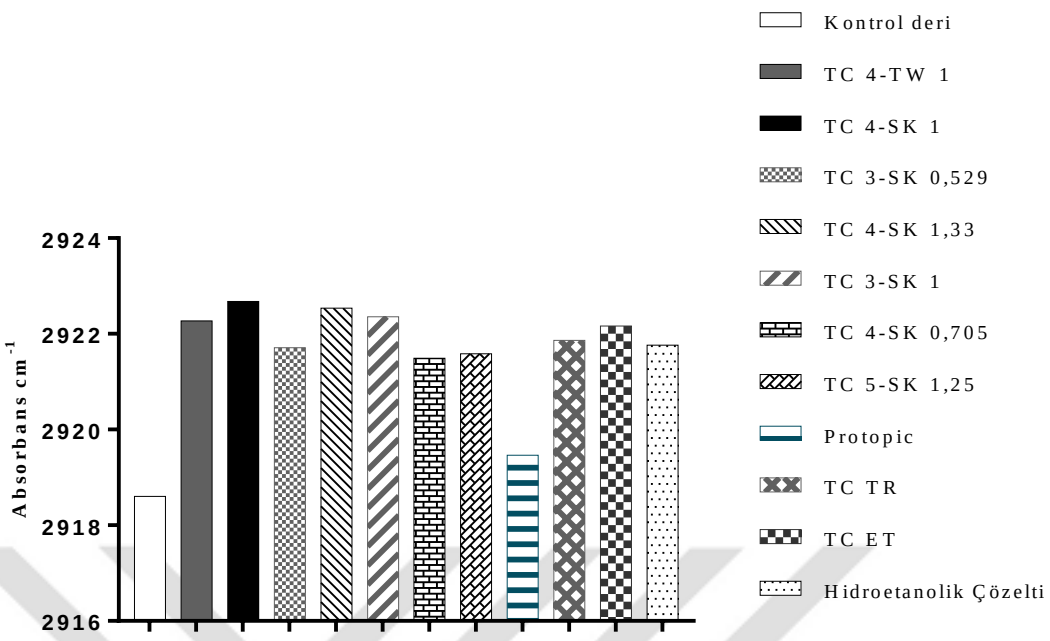
Şekil 4-51: Takrolimusun içeren hidroetanolik doymuş çözeltisinin uygulanmasının 24 saat sonrasında deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumu



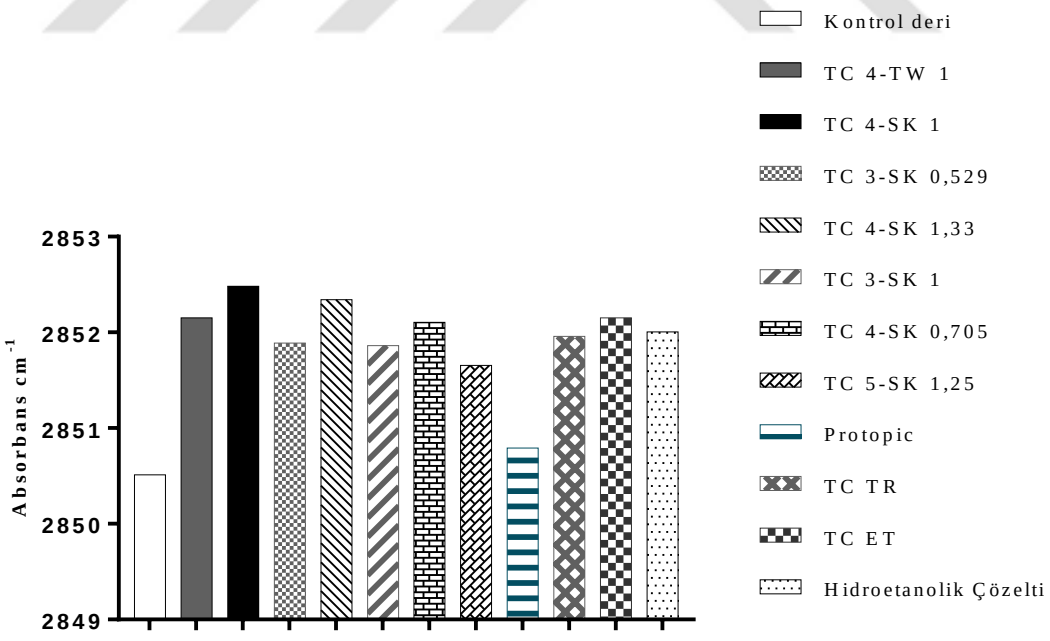
Şekil 4-52: Tazaroten yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait asimetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği



Şekil 4-53: Tazaroten yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait simetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği



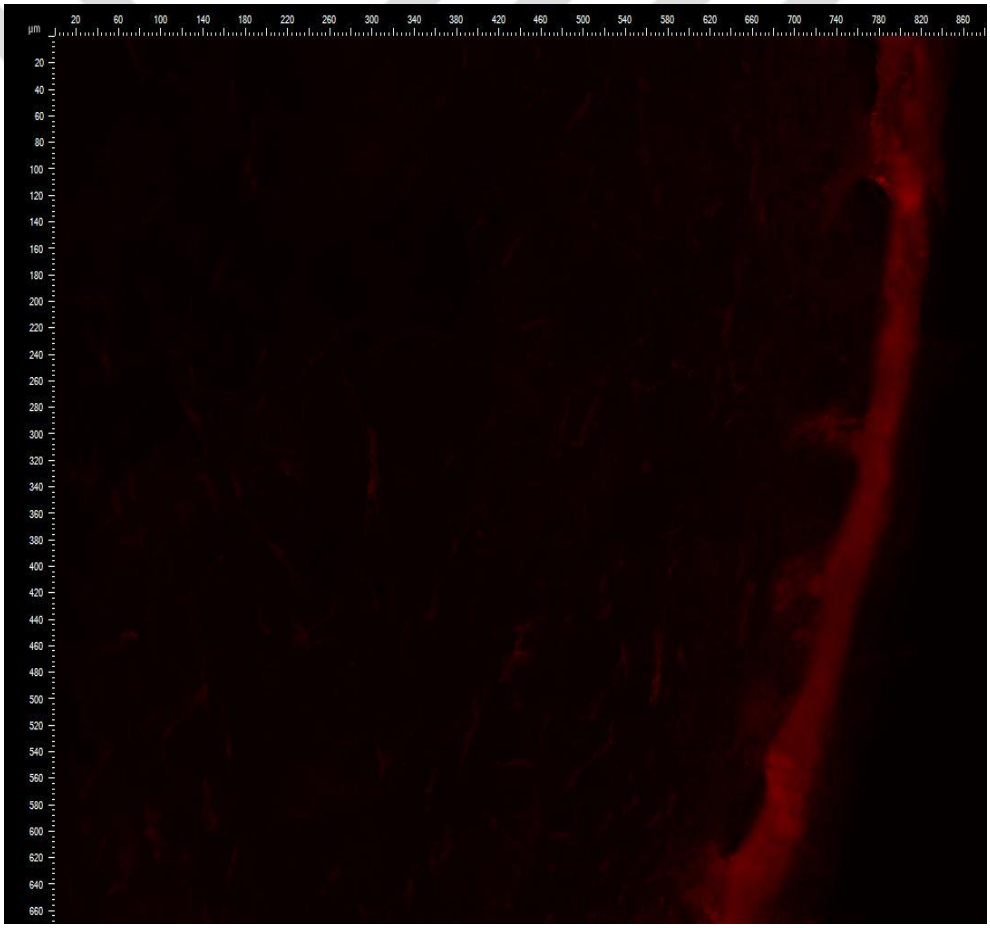
Şekil 4-54: Takrolimus yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait asimetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği



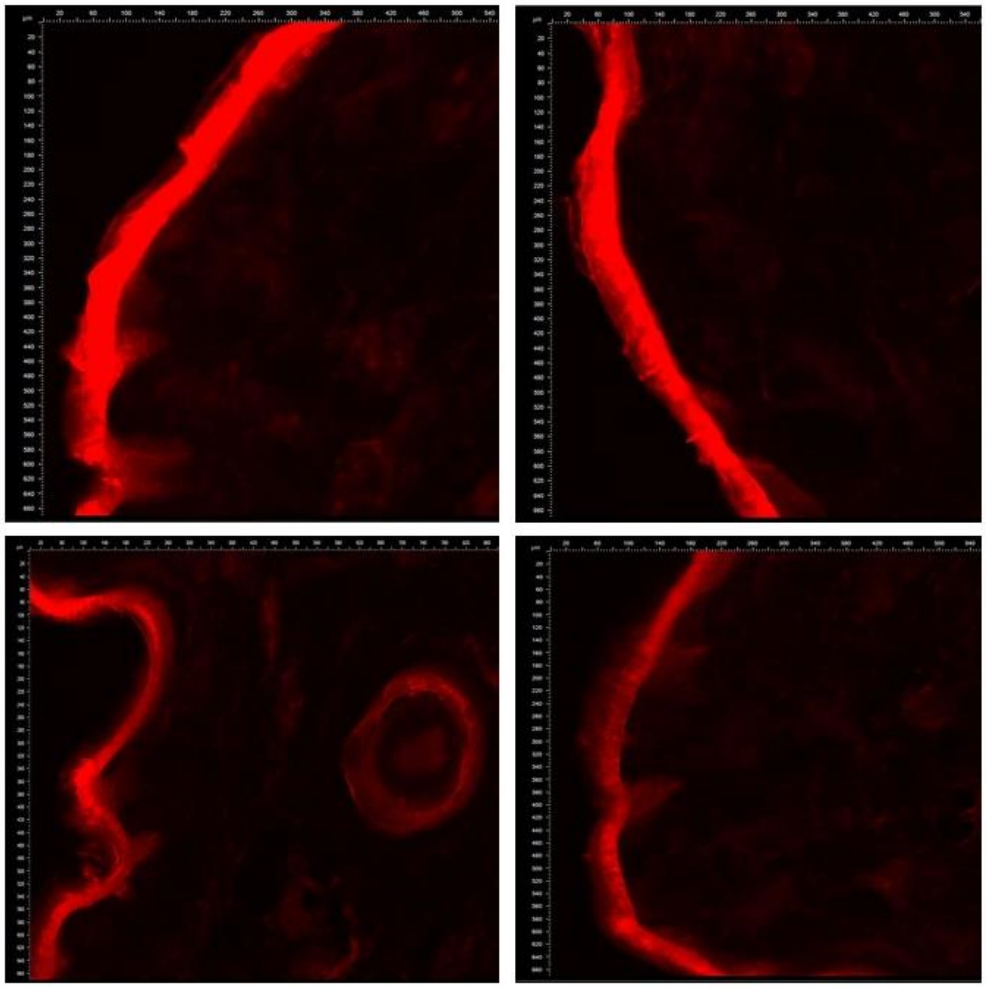
Şekil 4-55: Takrolimus yüklü formülasyonlar ve kontrollere ait simetrik gerilme bantların karşılaştırılmalı grafiği

4.14. Konfokal Lazer Mikroskop Analizi (CLMS) Görüntüleri

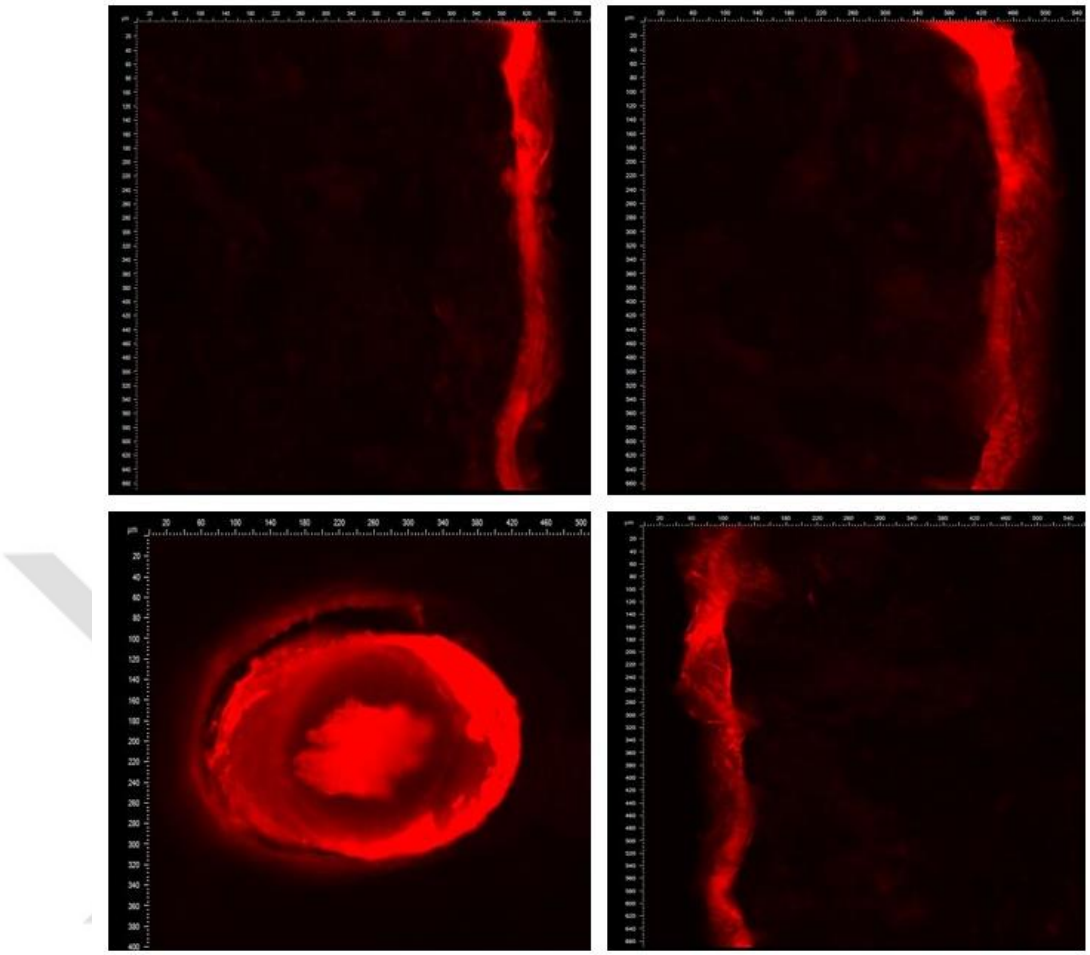
Yöntem 3.2.16'da belirtildiği gibi transetozomlar fluoresan veren Nil Kırmızısı içeren (model madde olarak) TZ 4-TW 1 (tazaroten için canlı epidermis+dermiste en yüksek birikim sağlayan transetozom formülasyonu) ve TC 4-SK 1 (takrolimus için canlı epidermis+dermiste en yüksek birikim sağlayan transetozom formülasyonu) kodlu transetozomlar ve kontrol çözeltisinin (Nil Kırmızısının pH 7,4 PBS'deki çözeltisi) 24 saat deriye uygulanmasını takiben, Nil Kırmızısı'nın derinin tabakalarındaki lokalizasyonuna ait deriden alınan dikey ve yatay kesitler ile elde edilen CLMS görüntüleri Şekil 4.56 - Şekil 4.62'de verilmiştir.



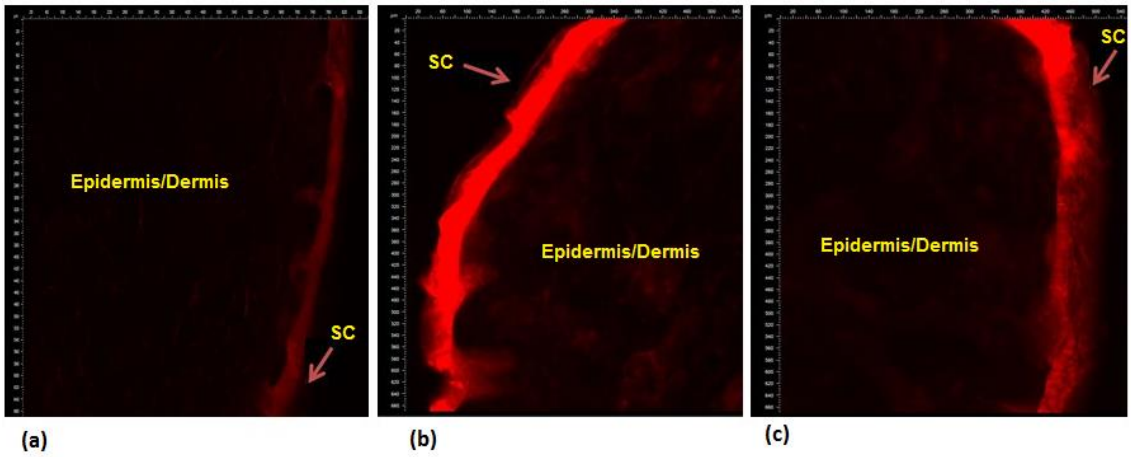
Şekil 4-56: Kontrol olarak Nil Kırmızısının PBS (pH 7,4) çözeltisinin deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri



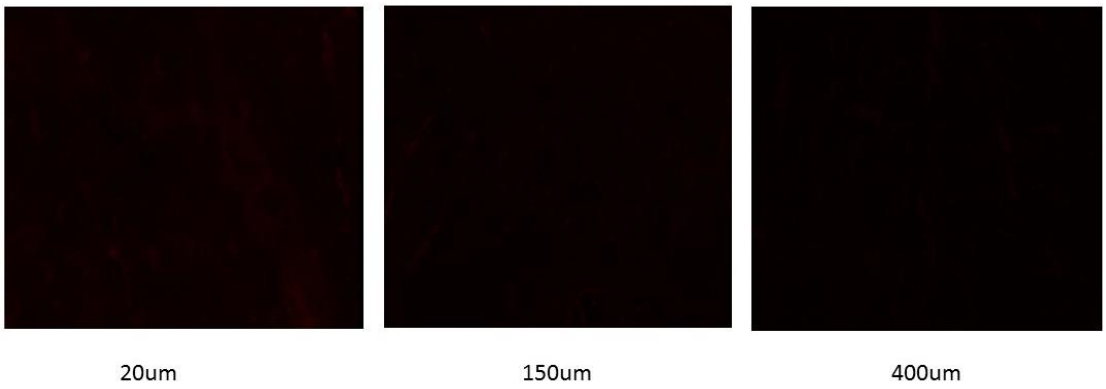
Şekil 4-57: TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri



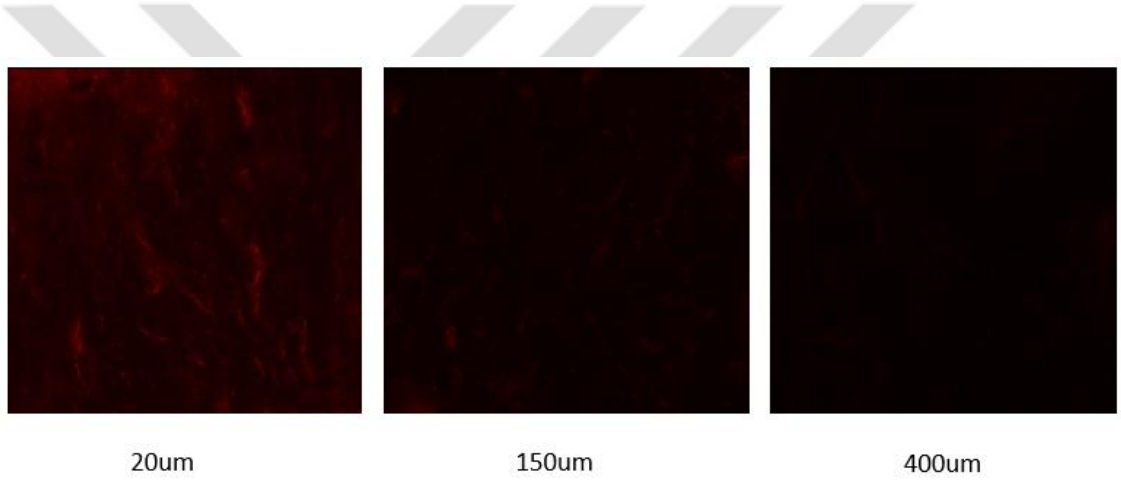
Şekil 4-58: TC 4-SK 1 kodlu formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri



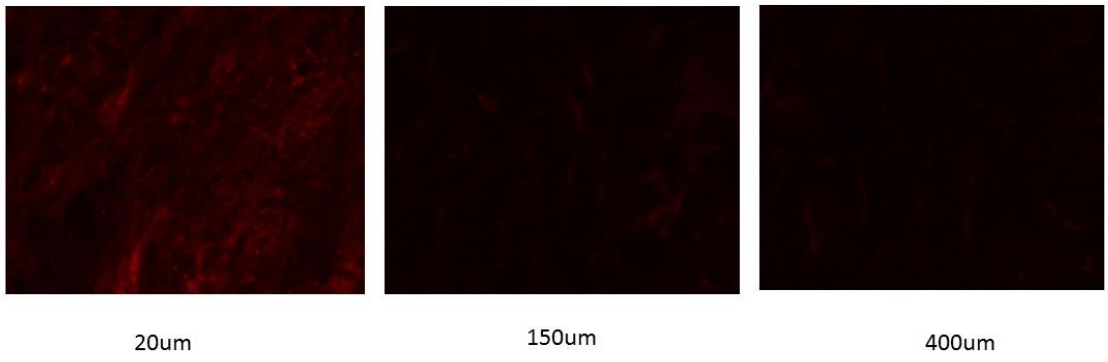
Şekil 4-59: Formülasyonlar ve kontrol arasında dikey kesite ait kıyaslama (kontrol çözeltisi (a), TZ 4-TW 1 (b) ve TC 4-SK 1 (c) kodlu transetozom deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık dikey kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri



Şekil 4-60: Kontrol olarak Nil Kırmızısı PBS 7,4 çözeltisinin deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık yatay kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri



Şekil 4-61: TZ 4-TW 1 formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık yatay kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri



Şekil 4-62: TC 4-SK 1 formülasyonun deriye uygulanmasını takiben 20 µm'lık yatay kesiti ile elde edilen CLMS görüntüleri

4.15. In vitro Sitotoksisite Çalışmaları Bulguları

İn vitro sitotoksisite çalışmaları ile değerlendirilen takrolimus ve tazaroten yüklü transetozomlar ile bu formülasyonların bileşenleri ile hazırlanan etkin madde yüklü olmayan tranzetozomların IC_{50} değerleri Tablo 4.66'da, kontrol amaçlı olarak kullanılan farklı konsantrasyondaki sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltilerinin IC_{50} değeri Tablo 4.67'de verilmiştir.

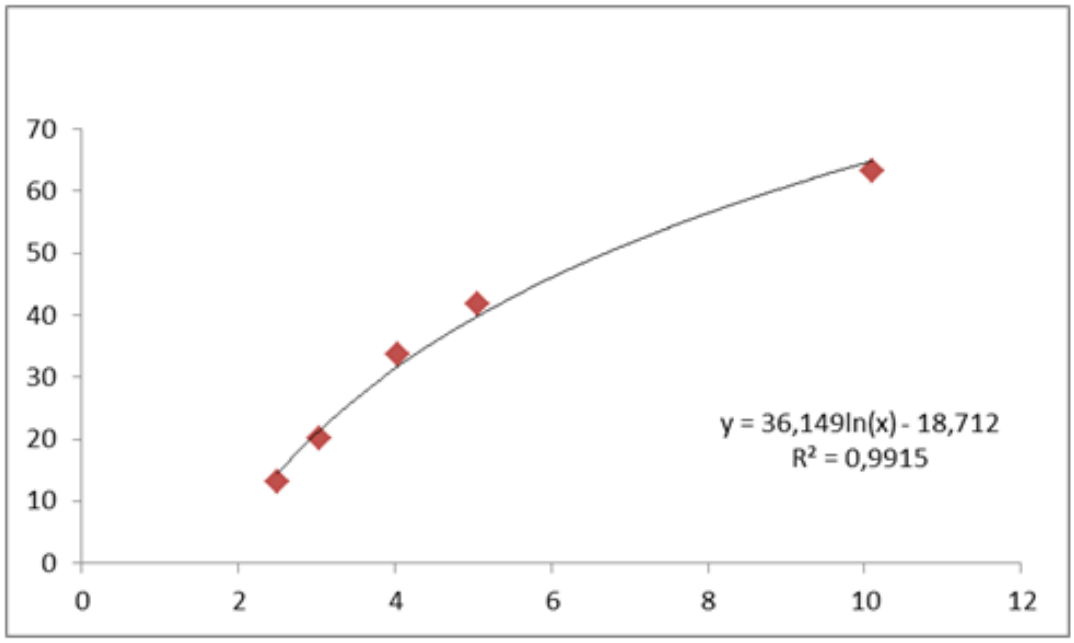
Tablo 4-66: Seçilen formülasyonlara ait IC_{50} değerleri

Formülasyonun kodu	Konsantrasyon (mg/mL)	% İnhibisyon	IC_{50} (mg/mL)
TZ 4-TW 1 kodlu tazaroten yüklü	10,1	63,37068	6,69
	5,05	41,86856	
	4,04	33,6917	
	3,03	20,0636	
	2,5	13,24955	
TZ 4-TW 1 Boş	10	72,00182	5,09
	5	53,98243	
	4	46,86554	
	3	31,07965	
	2,5	13,47668	
TC 4-SK 1 kodlu takrolimus yüklü	10,2	99,90157	2,80
	5,1	84,91066	
	4,08	77,79376	
	3,06	64,88492	
	2,55	42,39855	
	2,04	16,95942	
	1,02	6,321926	
TC 4-SK 1 Boş	10	99,4473	3,36
	5	79,34585	
	4	62,99213	
	3	39,48365	
	2,5	35,47093	
	2	8,858268	
	1	1,741369	

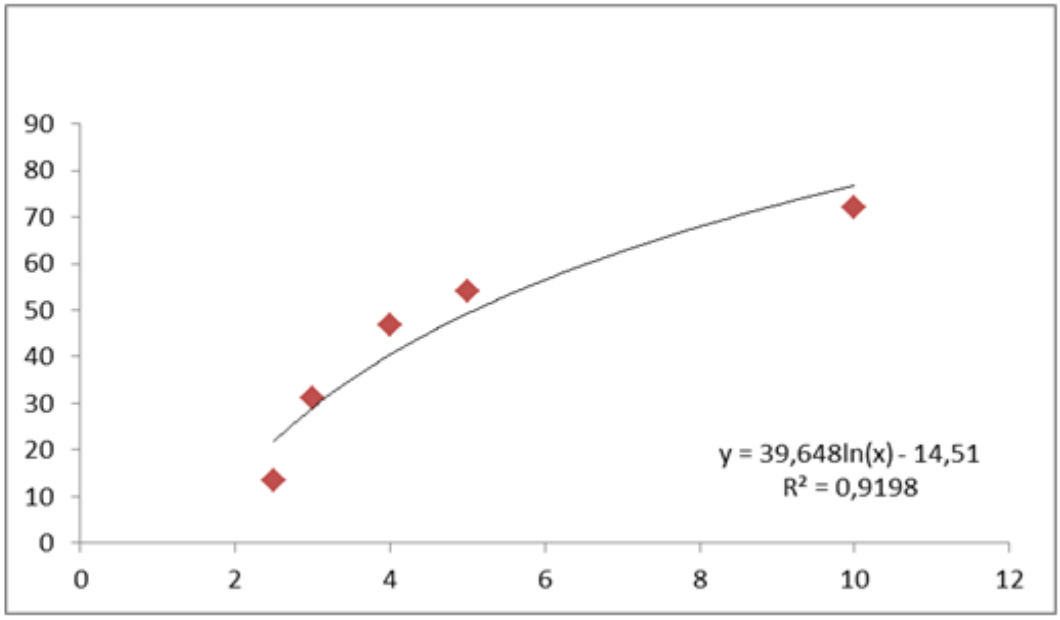
Tablo 4-67: Farklı konsantrasyonlardaki sodyum dodesil sülfata (SDS) ait IC_{50} değeri

Konsantrasyon (µg/mL)	%İnhibisyon	IC_{50} (µg/ml)
100	99,43	
50	60,45	
25	29,56	47,625 µg/ml
12,5	8,61	
6,25	6,79	

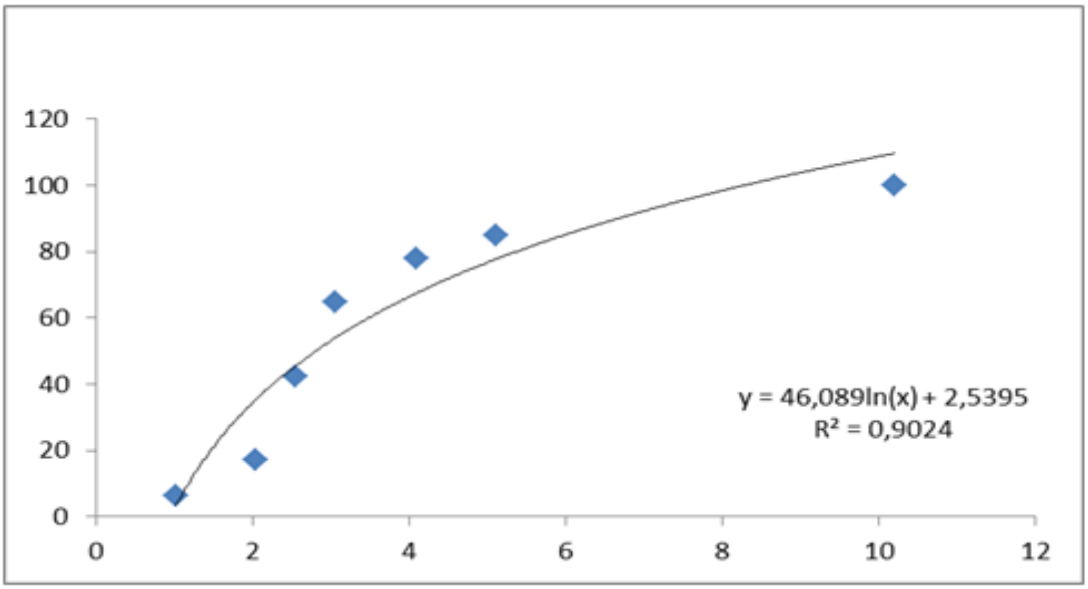
Transetozom formülasyonlarına ait %inhibisyon - konsantrasyon eğrisi Şekil 4.63-4.66'da; transetozom formülasyonlarının SDS'e göre karşılaştırmalı IC_{50} değerleri Şekil 4.67'de verilmiştir.



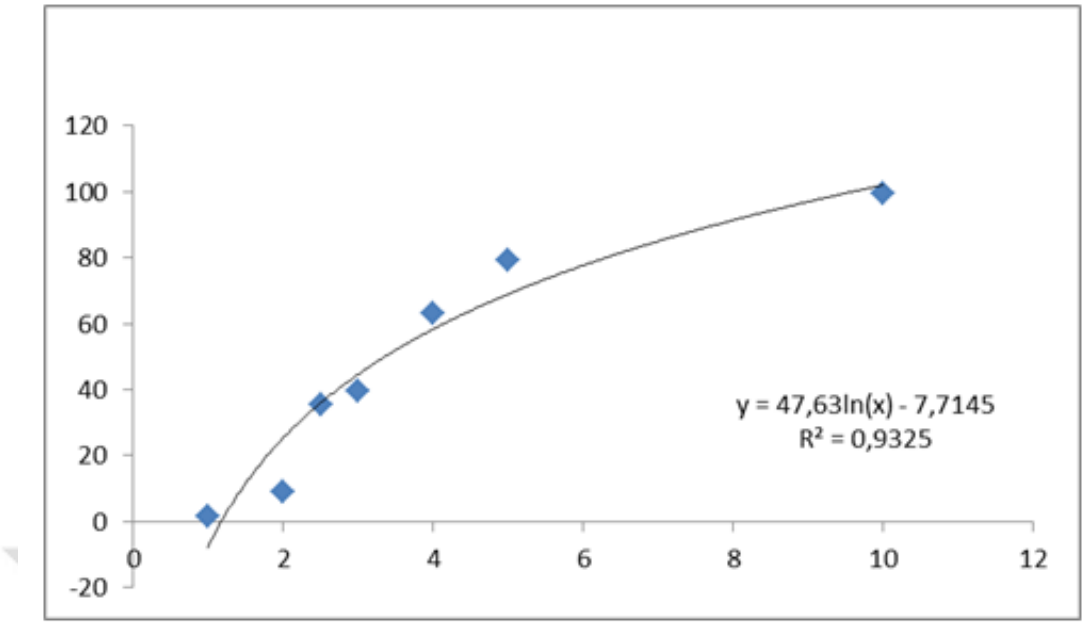
Şekil 4-63: Tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi



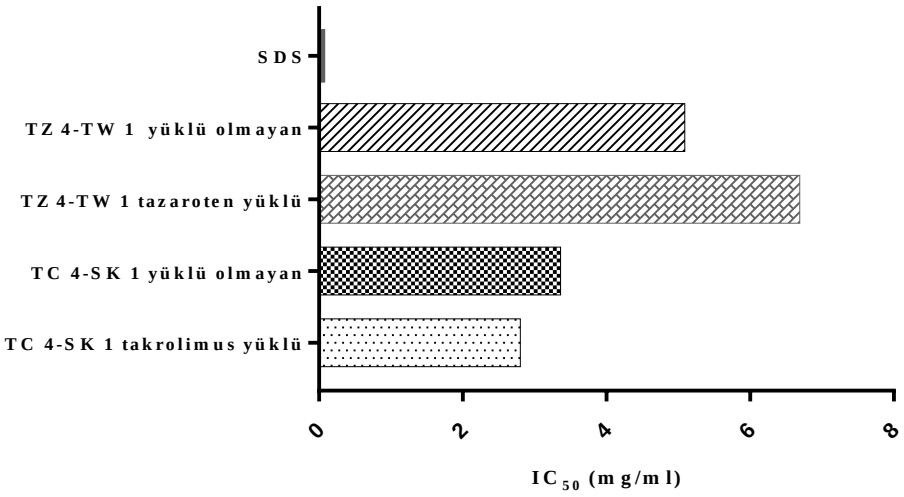
Şekil 4-64: TZ 4-TW 1 kodlu tazaroten içermeyen formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi



Şekil 4-65: Takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi



Şekil 4-66: TC 4-SK 1 kodlu takrolimus içermeyen formülasyona ait %inhibisyon-konsantrasyon eğrisi



Şekil 4-67: Seçilen formülasyonların SDS'e göre karşılaştırmalı IC_{50} değeri

5. TARTIŞMA

Psoriazis, ilk defa 1841'de Ferdinand von Hebra tarafından tanımlanan kronik bir deri hastalığıdır (Schön ve Boehncke 2005). Kızarıklık/eritem, enflamasyon, keratinosit tabakasının hiperproliferasyonu ve epiderma tabakasının farklılaşması psoriazisi tanımlayan dört temel deri anomalisidir (Mitra ve Wu 2010; Alwan ve Nestle 2015). Psoriazisin ortaya çıkş nedeninin genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin birlikte eşlik etmesiyle stratum corneum tabakasındaki keratinositlerin çoğalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir (Jean ve Pouliot 2010; Basko-Plluska ve Petronic-rosic 2012). Psoriaziste topikal tedavi, birinci yaklaşım olarak tanımlanır ve genellikle hastalığın lokalize olduğu formunun tedavisinde tercih edilir (Mitra ve Wu 2010; Berth-jones 2013).

Tazaroten psoriazis tedavisinde kullanılan sentetik özel bir retinoik asit reseptörüdür. Topikal uygulanmasının ardından derideki esteraz hidrolizi ile aktif metaboliti tazarotenik aside dönüşür. Tazarotenin aktif formu olan tazarotenik asit retinoik asit reseptörlerine seçici olarak ilgi duyar (Chandraratna 1997; Dando ve Wellington 2005; Van De Kerkhof 2006). Etki mekanizması, keratinositlerin anormal farklılaşmasını düzelterek bu hücrelerin çoğalmasını azaltmasına ve enflamatuvar belirteçlerin ekspresyonunu inhibe etmesine dayanmaktadır (Duvic ve ark. 1997; Yu ve ark. 2015). Tazaroten, aşırı lipofilik karakterde bir etkin maddde (log P=5,96) olduğu için topikal formülasyonlarının geliştirilmesi açısından problemli bir molekül olarak nitelendirilmektedir. Bu nedenle tazarotenin yeni ilaç taşıyıcılarının geliştirilmesi özellikle ilacın derideki hedef bölgelere ulaşmasını sağlanması açısından önem taşımaktadır. Ancak, tazarotenin yeni topikal taşıyıcılarının geliştirilmesi kapsamında bildiğimiz kadarıyla literatürde sadece mikroemülsiyonlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar görülmüştür (Nasr ve Abdel-hamid 2016; Patel ve ark. 2016). Tazarotenin veziküller taşıyıcı sistemlerinin optimizasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Takrolimus, FK506 olarak da bilinen önemli bir immün sistem baskılayıcı moleküldür. Takrolimusun topikal tedavide derideki ana hedef bölgesi dermiste bulunan lenfositlerdir. Takrolimus deride kalsinörin fosfataz enzimini inhibe ederek interlökin 2 *(IL-2)* geni transkripsiyonu inhibe eder ve böylece *T* lenfosit yanıtını engellenir.

Takrolimus esas olarak (*IL-2*) transkripsiyonunun engellenmesine bağlı olarak, *T* lenfositlerin aktivasyonunu durdurarak immünosüpresan etki gösterir (Thomson ve ark. 1995; Ruzicka ve ark. 1999; Patel ve ark. 2012). Atopik dermatit tedavisi için takrolimusun topikal merhemi onaylanmıştır, ancak henüz psoriazis tedavisi için sadece yüz ve *intertrijinöz* için endikasyon dışı kullanımı söz konusudur (Beck 2005; Goebel ve ark. 2011). Topikal olarak takrolimus %0,03 ve %0,1'lik merhem preparatları ile tedavide kullanılmaktadır (Undre ve ark. 2009). Takrolimus çok lipofilik (log P=3,96) ve yüksek molekül ağırlığında (822 g/mol) bir bileşik olması ideal bir topikal dozaj formunun hazırlanmasını zorlaştırmaktadır (Venkataramanan ve ark. 1995; Goebel ve ark. 2011). Bu kapsamda; takrolimusun modifiye edilmiş lipit nano-taşıyıcıları (NLC) (Pople ve Singh 2011), etozom tipi veziküler sistemi (Li ve ark. 2012), transferzom içeren jeli (Lei ve ark. 2013), mikroemülsyonu (Goebel ve ark. 2011) ve takrolimus içeren polimerik miseller taşıyıcısının (Lapteva, Mondon ve ark. 2014) geliştirilmesine yönelik çalışmalar mevcuttur. Takrolimusun transetozom formülasyonları ile ilgili bir çalışma literatürde bulunmamaktadır.

Deri hastalıklarında topikal tedavisinin başarısı, etkin maddelerin derinin hedef etki bölgesine ulaşmasına ve lokalizasyonuna bağlıdır. Topikal tedavinin etkinliğini arttırmak ve konvansiyonel dozaj şekillerinde görülen kısıtlamaların aşılabilmesi için son yıllarda topikal yeni nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi konusunda oldukça fazla sayıda araştırmanın yapıldığı dikkati çekmektedir (Cosco ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2013; Rahman ve ark. 2015; Güngör ve Rezigue 2017).

Lipozomlar, farklı yapıdaki lipitlerin kullanılması ile hazırlanan, bir veya iç içe geçmiş birden fazla lipit çifte tabaka içeren, iç kompartımanda sulu faz bulunan, küresel veziküllerdir (Pathak ve Thassu 2009; El Maghraby ve ark. 2006; El Maghraby ve ark. 2008). Konvansiyonel veziküller olarak lipozomlar deriye uygulandıktan sonra deri yüzeyine adsorbe olabilmektedirler. Ancak, lipozomların deriden permeasyonlarının oldukça zayıf olması, daha çok *stratum corneum*'un yüzeyinde ve derinin üst kısımlarında birikmeleri nedeniyle topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak çok fazla tercih edilmemektedirler. Bu nedenle, lipozomların bileşimleri modifiye edilerek, etkin maddelerin derinin daha derin dokularına taşıyabildiği öngörülen etozom ve

transferzom olarak isimlendirilen veziküler sistemler tasarlanmıştır (Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Ascenso ve ark. 2015).

Etozom ve transferzomlar, konvansiyonel lipozomlar ile karşılaştırıldığında derideki ilaçların lokalizasyonunu iyileştirmeleri nendeniyle *in vitro* ve *in vivo* topikal/transdermal ilaç taşıyıcı sistemler olarak geliştirilmiştir (Celia ve ark. 2012; Gupta ve ark. 2012; Song ve ark. 2012; Pradhan ve ark. 2013; Ascenso ve ark. 2015). Her iki taşıyıcı sistem çoğunlukla ilaçların deriden geçişinde oldukça başarılı olmasına rağmen, özellikle aşırı lipofilik etkin maddelerin *stratum corneum* tabakasını geçerek canlı epidermise ulaşabilmeleri ve böylelikle daha etkili bir tedavi sağlanabilmesi için, bileşimlerinde yüksek oranda etanol içeren transetozomlar optimize edilmiştir (Song ve ark. 2012).

Transetozomlar, transferzomlar ve etozomların özelliklerini ve üstünlüklerinin bir arada içeren lipit yapılı veziküllerdir. Bu ultra-deforme olabilen veziküller, ilk defa Song ve ark tarafından 2012'de tanımlanmıştır (Song ve ark. 2012). Transetozomlar bileşimlerinde bulunan bir kenar aktivatörü ile birlikte yüksek oranda etanol ile karakterize edilir (Song ve ark. 2012; Ascenso ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Abdulbaqi ve ark. 2016).

Bu doktora tezi kapsamında; topikal psoriazis tedavisine yönelik tazaroten ve takrolimusun transetozom tipi nano boyutlu veziküler ilaç taşıyıcı sisteminin optimizasyon çalışmaları yürütüldü. Her iki etkin maddenin miktar tayini yöntemleri geliştirilerek validasyonları yapıldı. Formülasyon optimizasyon çalışmaları kapsamında; transetozomların hazırlanması için farklı tip ve oranlarda kenar aktivatörleri ve farklı oranlarda fosfolipit kullanılarak transetozomlar hazırlandı. Seçilen transetozom formülasyonları; vezikül boyutları, polidispersite indeksleri, fiziksel stabiliteleri, zeta potansiyeleri, enkapsülasyon verimleri, TEM analizi bakımından değerlendirilerek karakterize edildi. Optimize edilen transetozomlar ile gerçekleştirilen in vitro deriye penetrasyon çalışmaları ile etkin maddelerin derinin hedef tabakalarındaki lokalizasyonu bant ile soyma (*tape stripping*) yöntemi kullanılarak kantitatif olarak incelendi ve formülasyonların deri üzerindeki etkileri ATR-FTIR spektroskopisi ile değerlendirildi. Ayrıca, optimum olarak belirlenen transetozom formülasyonlarına tazaroten ve takrolimus gibi çok lipofilik karakterdeki Nil Kırmızısı yüklenerek, bu model fluoresan boyanın derideki lokalizasyonu konfokal mikroskop analizleri ile

görüntülendi ve bu formülasyonların sitotoksitesi hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirildi.

Yapılan çalışmalarda öncelikle tazaroten ve takrolimusun IR spektrumları alınmıştır. Elde edilen IR spektrumlar literatürdeki tazaroten için (Badawy ve ark. 2010; Patel ve ark. 2016) ve takrolimus için (Patel, Panchal ve ark. 2013; Patel, Patel ve ark. 2013) kayıtlı spektrumlara uyum gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2).

Tazaroten yüklü formülasyonların enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanması *ve in vitro* penetrasyon çalışmalarına ait numunelerdeki tazarotenin miktar tayininin yapılması için literatürde kayıtlı olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanıldı (Madhu ve ark. 1997). Ayrıca bu yöntemin validasyon çalışmaları kapsamında doğrusallık, kesinlik (gün içi ve günler arası), doğruluk, seçicilik, teşhis limiti, miktar tayin limiti ve stabilitesi gibi parametreler gerçekleştirildi (ICH Harmonised Tripartite Guidline 2005). Doğrusallık çalışmasına ait standart doğrunun (Şekil 4.4) determinasyon katsayısının (r^2= 0,9999) yüksek olması nedeniyle doğru denkleminin miktar tayininde kullanılabileceği sonucuna varıldı. Gün içi (Tablo 4.2) ve günler arası (Tablo 4.3) kesinlik çalışmalarından elde edilen %RSD değerleri <%2 olarak bulunmuştur. Doğruluk çalışmasında yardımcı maddeler içeren formülasyonlar için geri kazanma değerlerinin %RSD değeri <%1 bulunmuştur. Seçicilik için, formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler, domuz derisi ve bantların tazarotenin alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptanmıştır. Ayrıca yöntemin teşhis limiti 0,007 μg/ml ve miktar tayin limiti 0,020 μg/ml olarak hesaplandı. Tazarotenin asetonitril ile hazırlanmış standart çözeltilerde 48 saat süre boyunca stabil kaldığı saptandı (Tablo 4.5). Bu bulgulara dayanarak, tazaroten için kullanılan analitik yöntemin ICH kılavuzuna göre valide olduğu gösterilerek, yapılan çalışmalarda tazarotenin miktar tayini için kullanılabileceğine karar verildi.

Takrolimus yüklü formülasyonların enkapsülasyon etkinliğinin hesaplanamsı için literatürde kayıtlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri (Shi ve ark. 2012; Seo ve ark. 2015) üzerinde bazı değişiklikler yapılarak bir HPLC analiz yöntemi oluşturuldu ve ICH kılavuzuna göre yöntemin validasyonu yapıldı (ICH Harmonised Tripartite Guidline 2005). Validasyon çalışmaları kapsamında; doğrusallık, kesinlik (gün içi ve günler arası), doğruluk, seçicilik, teşhis limiti, miktar tayin limiti ve stabilitesi gibi parametreler gerçekleştirildi. Doğrusallık çalışmasına ait standart

doğrunun (Şekil 4.6) determinasyon katsayısının (r^2= 0,9997) yüksek olması nedeniyle doğru denkleminin miktar tayininde kullanılabileceği sonucuna varıldı. Gün içi (Tablo 4.7) ve günler arası (Tablo 4.8) kesinlik çalışmalarında elde edilen %RSD değerleri <%2 olarak bulunmuştur. Doğruluk çalışmasında yardımcı maddeler içeren formülasyonlar için geri kazanma değerlerinin %RSD değeri <%3 bulunmuştur. Seçicilik için, formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddelerin, takrolimusun alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptanmıştır. Ayrıca yöntemin teşhis limiti 0,048 μg/ml ve miktar tayin limiti 0,146 μg/ml olarak hesaplandı. Takrolimusun asetonitril ile hazırlanmış çözeltilerinin 48 saat süre boyunca stabil kaldığı saptandı (Tablo 4.10). Bu bulgulara dayanarak, takrolimus için kullanılan analitik yöntemin ICH kılavuzuna göre valide olduğu gösterilerek, yapılan çalışmalarda tazarotenin miktar tayini için kullanılabileceğine karar verildi.

Takrolimusun, in vitro deriye penetrasyon çalışmalarındaki örneklerdeki takrolimus miktarlarının, miktar tayini için kullanılan HPLC yönteminin MTL limitinin altında olması nedeniyle dolayı daha hassas bir analitik cihaz olan LC-MS (Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi) yöntemi kullanılmıştır. LC-MS yöntemi için 5-2500 ng/ml aralığındaki konsantrasyonlara ait standart doğru (Şekil 4.8) için yüksek determinasyon katsayısı (r^2= 0,9991) hesaplandı, miktar tayin limiti 1 ng/ml olarak bulundu. Bu bulgulara dayanarak, LC-MS hassas yönteminin takrolimusun derideki miktarı saptanmak için kullanılabileceğine karar verildi.

Çalışmamızda tazaroten ve takrolimus yüklü optimum transetozom formülasyonlarını seçmek için; farklı oranlarda fosfolipit, kenar aktivatörüleri ve penetrasyon arttırıcı ile etanol kullanılarak formülasyon optimizasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Formülasyonlar transetozomlar için literatürde kayıtlı olan “ince film hidrasyon yöntemi” ile rotavapor ve sonikatör kullanılarak hazırlandı (Cevc ve ark. 1997; El Maghraby ve ark. 2001; Pathak ve Thassu 2009; Song ve ark. 2012; Moghassemi ve Hadjizadeh 2014). Bu yöntemde oluşan ince film geniş bir yüzey alanı oluşturur, böylece veziküllerin tam hidratasyonunu sağlayabilmektedir. Bu durum veziküllerin enkapsülasyon etkinliğinin iyileşmesi açısından önem taşır (Jain ve ark. 2003; Mahmood ve ark. 2014). Optimizasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan formülasyonlar, film oluşturabilme kapasitesi ve veziküllerin nanoboyutta elde edilmesi açısından değerlendirildi.

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının oluşturulması için fosfolipit olarak Phospholipon 90 G (Soya fasulyesinin lesitininden saflaştırılmış fosfatidilkolin, fosfatidilkolin ≥ %94) kullanıldı. Tazaroten yüklü formülasyonların bileşiminde fosfolipit konsantrasyonu %3-6 (a/h), takrolimus yüklü olanların bileşiminde ise %2-6 (a/h) olarak denendi. Transetozomların oluşturulmasında; kenar aktivatörü veya yardımcı madde olarak Tween 80, Sodyum kolat, Span 80, Span 85 ve oleik asit denendi. Tazaroten ve takrolimus için optimizasyon çalışmalarında kullanılan fosfolipit, kenar aktivatörleri veya yardımcı maddeler, etanol ile kullanılması planlanan miktar ve oranları sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de gösterildi.

Tazaroten transetozomlara öncelikle %0,1 oranında yüklenmeye çalışıldı. Ancak hazırlanan formülasyonlara yüklenen tazarotenin veziküler sistemde bir kaç saat sonra çöktüğü gözlendi. Bu nedenle, transetozomlara tazarotenin %0,05 oranında yüklenmesine karar verildi. Etkin maddenin bu konsantrasyonda da bir ticari ürünü mevcut olup aynı zamanda, bir çalışmada da %0,05 tazaroten içeren mikroemülsyonların hazırlanmıştır (Patel ve ark. 2016). Takrolimus ise bütün formülasyonlara ticari merhem preparatı gibi (Protopic®) %0,1 oranında yüklenmiştir.

Yapılan optimizasyon çalışmalarında, tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomların hazırlanmasında denenen kenar aktivatörlerinden Tween 80 ve sodyum kolat ile başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak, her iki maddenin transetozomların oluşturulması için kenar aktivatörü olarak Span 80, Span 85 ve penetrasyon arttırıcı olarak oleik asit kullanıldığında transetozomlar oluşturulamamıştır. Span 80 ve Span 85 kullanıldığında ise; sonikasyon uygulandıktan sonra bile süt görünümünde bir süspansyon elde edilmiş, bu dağılımın vezikül boyutu ölçüldüğünde de dispersiyonun nano boyutta olmadığı ve PDI değerinin çok yüksek (1'e çok yakın) olduğu saptanmıştır. Penetrasyon arttırıcı madde olarak oleik asit içeren formülasyonların hazırlanmasında sonikasyon uygulandıktan sonra bir faz ayrımı görülmüştür, bu nedenle oleik asit ilave edilmemesine karar verildi.

Transetozomların formülasyonlarında etanol % 10-40 aralığında kullanılmaktadır (Tablo 2.4). Etanol, aynı zamanda, topikal formülasyonlarda sıklıkla kullanılan bir penetrasyon arttırıcıdır. Formülasyonlardaki miktarının artmasına bağlı olarak etkin maddelerin deriden geçiş hızı veya derideki birikimini arttırmaktadır (Touitou ve ark. 2000; Cosco ve ark. 2008; Rao ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2012; Li ve

ark. 2012; Meng ve ark. 2013; Abdulbaqi ve ark. 2016; Garg ve ark. 2017). Bu yaklaşımlarla, her iki etkin madde ile yüklü transetozomların oluşturulmasında formülasyonların bileşiminde etanol konsantrasyonu % 10-40 (h/h) aralığında olacak şekilde denenmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında takrolimus için bileşiminde %10 etanol içeren formülasyonlar ile transetozomların oluşturulamadığı görülmüştür. Benzer şekilde, tazaroten için de hazırlanan veziküler sistemdeki etanol konsantrasyonu %10 olduğunda; stabil olmayan ve vezikül boyutu dağılımı geniş veziküller elde edilmiştir (Tablo 4.12 ve Tablo 4.17). Bu nedenle, etanolün %10 konsantrasyonda yeterli olmadığına karar verilmiştir. Aynı şekilde her iki madde için, formülasyonların bileşimine %40 etanol ilavesi ile hazırlanan transetozomların nano boyutta olmadığı saptanmış ve başarılı bir şekilde formülasyonlar oluşturulamamıştır. Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomların bileşiminde %20-30 etanol kullanıldığında ise yarı-saydam görünümlü dispersiyon şeklinde transetozomlar elde edilmiş ve transetozomların oluşturulabildiği saptanmıştır (Şekil 4.11). Ayrıca, deriye penetrasyon çalışmalarında etanolün etkisini değerlendirmek için kontrol amacıyla %20 etanol içeren tazaroten yüklü transetozom formülasyonu da hazırlanmıştır.

Tazaroten yüklü transetozomların optimizasyonunda denenen formülasyonların bileşenleri Tablo 3.3 ile Tablo 3.5 aralığında gösterilmiştir. Tazaroten yüklü transetozomların oluşturulmasında kenar aktivatörlerinin (Tween 80 ve sodyum kolat) konsantrasyonu sırası ile %0,5-1,33 ve %0,5-1,0 arasında değiştirildi. Fosfolipit olarak Phosphlipon 90G ise %3-6 oranında kullanıldı. Formülasyonlar nano boyutta veziküllerin oluşturulması açısından değerlendirilerek tazaroten yüklü uygun bulunan transetozomlar Tablo 4.12 ve Tablo 4.13'te verilmiştir. Uygun bulunan transetozomların vezikül boyutu ve polidispersite indeksi değerleri ölçüldü, ardından fiziksel stabiliteleri değerlendirildi.

Takrolimus yüklü transetozomların optimizasyonunda denenen formülasyonların bileşenleri Tablo 3.6 ile Tablo 3.15 aralığında gösterilmiştir. Takrolimus yüklü transetozomların oluşturulmasında kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanıldığında fosfolipit (Phosphlipon 90G) konsantrasyonu %2-6 arasında; sodyum kolat ile hazırlanan transetozomlarda ise %3-6 arasında kullanıldı. Bu formülasyonlar fosfolipit ve kenar aktivatör oranları 75:25, 80:20, 85:15, 90:10 (a:a) olarak hazırlandı. Literatürde bu oranları transferzom hazırlamak üzere kullanan çalışmalar mevcuttur

(Jain ve ark. 2003; Mahor ve ark. 2007; Alvi ve ark. 2011; Nidhi ve ark. 2011, Raza ve ark. 2011; Ahmed ve ark. 2015). Kenar aktivatörü olarak Tween 80 ve Sodyum kolat kullanıldığında, takrolimus yüklü transetozomlardan sadece %2 sodyum kolat ve %6 fosfolipit kullanılarak hazırlanan formülasyon ile nano boyutta veziküller oluşturulamamıştır (Tablo 4.15 - Tablo 4.23).

Optimize edilen tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının öncelikle vezikül boyutu ve polidispersite indeksi değerlendirildi.

Kenar aktivatörü olarak Tween 80 kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının boyutları 66,09±4,86-131,01±1,07 nm arasında iken (Tablo 4.28); sodyum kolat kullanılarak hazırlanan tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının boyutları 45,25±0,065-62,85±5,414 nm arasında (Tablo 4.29) bulunmuştur. Kenar aktivatörü olarak Tween 80 içeren transetozomların polidispersite indeksleri, %10 etanol ile hazırlanan formülasyon ve TZ 3-TW 0,53 kodlu formülasyon dışında, 0,067±0,011-0,128±0,019 nm arasında bulunmuştur. Kenar aktivatörü olarak sodyum kolat içeren transetozom formülasyonların polidispersite indeksleri ise, TZ 4-SK 1-20 ve TZ 6-SK 0,66 kodlu transetozomlar dışında, 0,095±0,016-0,176±0,008 arasında değişmiştir. Elde edilen bu bulgular, tazaroten yüklü transetozomların nano boyutta, dar dağılımda ve homojen veziküler sistemler olduğunu göstermektedir. Literatürde, daha küçük vezikül boyutlarına sahip veziküllerin ilaç moleküllerinin deri tabakalarına penetrasyonlarını arttırılması açısından daha etkili olabileceği kayıtlıdır (Verma ve ark. 2003; Ma ve ark. 2015).

Takrolimus yüklü uygun transetozom formülasyonların boyutları Tablo 4.30 ile Tablo 4.38 aralığında verilmiştir. Sodyum kolat ile hazırlanan transetozomların Tween 80 ile hazırlananlara göre daha küçük boyutta ve daha dar bir dağılıma sahip olduğu görülmüştür.

Tween 80 ile hazırlanan takrolimus yüklü transetozomların (TC 5-TW 1,66 ve TC 5-TW 1,25 dışında) boyutları 69,26±2,035-162,14±2,316 nm, PDI değerleri (TC 6-TW 1,058 ve TC 5-TW 1,25 dışında) 0,047±0,038-0,280±0,004 arasında bulunmuştur (Tablo 4.30-4.34). Sodyum kolat ile hazırlanan transetozmların (TC 5-SK 1,66 dışında) boyutları ise 44,96±2,96-95,58±9,94 nm, PDI değerleri (TC 5-SK 1,66 dışında) 0,053±0,009-0,163±0,006 arasında bulunmuştur (Tablo 4.35-4.38).

Bu bulgulara göre, sodyum kolat ile hazırlanan transetozomların (TC 5-SK 1,66 kodlu transetozom dışında) boyutlarının 100 nm'den küçük ve PDI'larının 0,2'den küçük olduğu görülmüştür. Özellikle, TC 5-SK 1,25; TC 4-SK 1,33; TC 4-SK 1; TC3-SK 1 ve TC3-SK 0,705 kodlu transetozomların PDI'ları çok düşük (PDI< 0,1) oduğu görülmüştür. Bu sonuçlar hazırlanan transetozomların homojen bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir.

Takrolimus yüklü yüksek konsantrasyonlarda (%5-6) fosfolipit içeren transetozomların boyutları (TC 6-TW 2; TC 6-TW 1,5; TC 6-TW 1,058; TC 5-TW 1,66; TC 5-TW 1,25; TC 5-TW 0,88 ve TC 5-SK 1,66); diğer transetozomlara göre ise yüksek bir dağılım (PDI >0,2) vermiştir.

Her iki etkin madde ile yüklü sodyum kolat ile hazırlanan transetzomların boyutları ise Tween 80 ile hazırlananlara göre daha küçük bulunmuştur. Bu durum, Tween 80'in non-iyonik bir sürfaktan, sodyum kolatın ise anyonik özellikte bir sürfaktan olması ile açıklanabilir. Sodyum kolatın anyonik yapısı nedeni ile oluşan elektrostatik itme kuvvetleri, veziküllerin birbirinden ayrılabilmesini sağlamaktadır, dolayısı ile daha küçük boyutta veziküller oluşturabildiği düşünülmektedir (White ve ark. 2007; Kumar ve ark. 2012).

Tazaroten ve takrolimus yüklü sabit konsantrasyonda fosfolipit içeren transetozomların bileşimindeki kenar aktivatörü (Tween 80 veya sodyum kolat) konsantrasyonu arttıkça transetozomların boyutunun arttığı saptanmıştır (Tablo 4.28 ve 4.30-38). Lopez ve arkadaşları (Lopez ve ark. 1998), lipit veziküllere sürfaktanların farklı konsantrasyonda eklenmesi ile boyutta değişiminin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, ilk olarak sürfaktan düşük konsantrasyonda lipide eklendiğinde; belli bir düzeye ulaşana kadar veziküllerin boyutunda bir artış gözlenmiştir. Bu aşamada sürfaktan ile karışmış lipit veziküllerin oluştuğu belirtilmiş ve boyuttaki artış sürfaktanın fosfolipit veziküllerine birleşmesinden kaynaklanmasına bağlı olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda da aynı şekilde; transetozmların oluşturulmasında kullanılan sürfaktan miktarı arttırıldıkça veziküllerin büyüdüğü gözlenmiştir. Dolayısı ile, kullanılan sürfaktan miktarının ilk geçiş aşaması olarak büyüme aşamasında bulunduğunu düşünülmektedir. Benzer bulgular başka araştırıcılar tarafından da gösterilmiştir (Polozova ve ark. 1995; Partearroyo ve ark. 1996; Silvander ve ark. 1996). Lopez ve arkadaşlarına göre, boyutun artması aşamasından sonra (ilk

aşama), sürfaktan lipide daha fazla konsantrasyonda eklendiğinde lipit çift tabakanın doygunluk seviyesine ulaşılmaktadır. Ardından, sürfaktan konsantrasyonunun arttırılmasıyla bir çözündürme işleminden dolayı, sürfaktan-lipit karışık miseller (*mixed micelles*) oluşur, bu küçük boyuttaki karışık miseller oluştuğu için vezikülün boyutunun azaldığı (bu azalma 10 nm'kadar olabilmektedir) ve bu yapıların da ilaç moleküllerinin deriye penetrasyonunu azalttığı öne sürülmektedir (Lopez ve ark. 1998; Nishi ve ark. 2011).

Çalışmamızda, ayrıca tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının deriye penetrasyon çalışmalarında etkinliğini karşılaştırmak amacı ile kontrol formülasyonu olarak ince film hidrasyon yöntemi" kullanılarak tazaroten ve takrolimus yüklü "transferzom" ve "etozom" tipi veziküler taşıyıcı sistemleri de hazırlandı (Tablo 3.16).

Tazarotenin TZ TR kodlu transferzom ve TZ ET kodlu etozomun boyutları sırası ile 63,97±2,070 nm ve 108,23±2,081 nm olarak bulunmuştur. Ancak, bu formülasyonların boyut dağılımı çok yüksek (sırası ile 0,348±0,039 ve 0,4480±0,069) bulunmuştur (Tablo 4.54). Tazaroten yüklü transferzom (TZ TR) ve etozom (TZ ET) ile aynı bileşenlere sahip transetozom formülasyonun (TZ 4-TW 1) boyutu 101,07±3,797 nm ve PDI değeri 0,090±0,011 olarak bulunmuştur. Takrolimusun TC TR kodlu transferzom ve TC ET kodlu etozomlarının boyutları sırası ile 83,37±1,407 nm ve 101,41±1,719 nm olarak bulunmuştur. Ancak, bu formülasyonların boyut dağılımı da çok yüksek (0,298±0,006 ve 0,397±0,061 sırasıyla) bulunmuştur (Tablo 4.54). Benzer şekilde takrolimus ile yüklü transetozom (TC TR) ve etozom (TC ET) ile aynı bileşenlere sahip transetozom formülasyonun (TC 4-SK 1) boyutu da 70,41±3,227 nm ve PDI değeri 0,082±0,008 olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu bulgular, aynı yöntemle hazırlanan tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının boyut ve dağılım açısından diğer iki vezikül sistemine göre daha üstün olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde özellikle lipofilik karakterdeki ilaç moleküllerinin transetozomların tranferzom ve etozomlara göre daha küçük boyutta olduğu literatürde kayıtlıdır (Song ve ark. 2012; Guo ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Garg ve ark. 2017).

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomların fiziksel stabilitesini değerlendirmek amacıyla, formülasyonlar 5°C±3°C'de buzdolabında saklandı ve belirli

zaman aralıklarında alınan örnekler görsel olarak etkin madde çökmesi, faz ayrımı ve vezikül boyutu ile dağılımları açısından değerlendirildi.

Tazaroten yüklü transetozomlardan 5±3°C'de fiziksel kararlılıkları görsel olarak incelelenen ve 1 haftada çökme gösterenler daha sonraki karakterizasyon çalışmalarına alınmadı ve elendi (Tablo 4.39 ve 4.40). Seçilen tazaroten yüklü transetozom formülasyonlarının 5±3 °C'de üç hafta süre ile izlenen vezikül boyutu ve dağılımı bulguları Tablo 4.41 ve Tablo 4.42'de verilmiştir. Bütün transetozomların 3 hafta süre ile boyutlarının (<200 nm) ve PDI değerlerinin (<0,3) fazla yükselmediği görülmüştür. Özellikle, TZ 4-TW 1 kodlu transetozom daha iyi stabilite göstermiştir.

Vezikül boyutu ve dağılımı ile fiziksel stabilite çalışması bulguları değerlendirilerek tazaroten yüklü transetozom formülasyonları (Tablo 4.43) daha sonraki yapılacak karakterizasyon çalışmaları için seçilmiştir.

Takrolimus yüklü transetozomların 5±3 °C'de 4 ay boyunca fiziksel görünüşünde görsel olarak hiçbir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Takrolimus yüklü transetozom formülasyonlarının 5±3 °C'de 4 ay süre ile izlenen vezikül boyutu ve dağılımı bulguları Tablo 4.44-4.52'de verilmiştir. %6 ve % 5 konsantrasyonda fosfolipit ve 75:25, 80:20 ve 85:15 oranlarında fosfolipit:Tween 80 ile hazırlanan transetozomlar ilk hazırdıklarında da boyut ve dağılım açısından yüksek değerler vermiştir, 4 ay stabilite süresinde bu değerlerin daha da arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.44 ve 4.45). Diğer takrolimus yüklü transetozomlar 4 ay boyunca genellikle iyi bir fiziksel stabilite göstermiştir (Tablo 46 – Tablo 52). Sodyum kolat ile hazırlanan takrolimus yüklü transetozomlar (%6 fosfolipit içerenler ve TC 5-SK 1,66 dışında) 4 ay boyunca özellikle TC 5-SK 1,25; TC 4-SK 1,33; TC 4-SK 1; TC 4-SK 0,705; TC 3-SK 1; TC 3-SK 0,75; TC 3-SK 0,529 ve TC 3-SK 0,333 kodlu formülasyonlar boyut ve dağılım açısından iyi fiziksel stabilite göstermiştir (Tablo 50-Tablo 52).

Takrolimus yüklü transetozom formülasyonları, vezikül boyutu ve dağılımı ile fiziksel stabilite bulguları yanında, formülasyon bileşenleri (toplam lipit konsantrasyonu, fosfolipit: kenar aktivatörü oranı, kenar aktivatörün tipi, etanol:su karışım oranları gibi) de değerlendirilerek daha sonraki karakterizasyon çalışmaları için seçildi. Bu kapsamda; kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanılarak hazırlanan transetozomlar Tween 80 ile hazırlananlara göre daha küçük vezikül boyutu ve dağılmına sahip ve oldukça stabil olduğu için (Tablo 4.50 - 4.52); TC 5-SK 1,25; TC 4-

SK 1,33; TC 4-SK 1; TC 3-SK 1; TC 4-SK 0,705; TC 3-SK 0,529 kodlu transetozomlar *in vitro* deriye penetrasyon çalışmaları açısından tercih edildi. Literatürde, daha küçük vezikül boyutlarına sahip veziküler sistemlerin ilaç moleküllerinin deriye penetrasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Verma ve ark. 2003; Ma ve ark. 2015).

Diğer takrolimus yüklü formülasyonlar ise belirtilen nedenlerden dolayı daha sonra yapılacak karakterizasyon çalışmalarına dahil edilmemiştir. %5 ve 6 fosfolipit ile kenar aktivatörü olarak Tween 80 içeren (fosfolipit: sürfaktanın oranı (90:10) dışında) elde edilen transetozomların boyutları ve dağılımı yüksek bulunmuştur (Tablo 4.44 – Tablo 4.45), bu nedenle bir sonraki çalışmalarda bu formülasyonlar kullanılmadı. %2 fosfolipit konsantrasyonu ile hazırlanan transetozomların boyutunun diğer transetozomlara göre büyük olması (162,14±2,316), boyutu küçük olan formülasyonların bileşimde kulanılan sürfaktan miktarının düşük olması (%0,22) nedeniyle (Tablo 4.48) diğer çalışmalar için seçilmemiştir. *İn vitro* deriden geçiş çalışmalarında formülasyonlardaki etanolün miktarı artıkça daha fazla ilacın deriden geçeceği veya birikeceği beklendiği için TC 4-TW 1-20 kodlu transferzom bir sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır.

Transetozom formülasyonlarından takrolimusun deriye *in vitro* penetrasyonun analizinde LC-MS yönteminin kısıtlı kullanılmasından dolayı bir sonraki çalışmalar için TC 4- TW 1; TC 4- SK 1; TC 3-SK 1; TC 4- SK 1,33; TC 4-SK 0,705; TC 3-SK 0,529; TC 5-SK 1,25 kullanılmıştır (Tablo 4.53). Ayrıca, bu seçilen formülasyonların vezikül boyutu ile PDI değerlerinin oldukça düşük olduğu ve 4 aylık fiziksel stabilite çalışmalarında diğer formülasyonlara göre daha iyi kararlılık gösterdiği saptanmıştır.

Tazroten ve takrolimus yüklü transferzom ve etozom formülasyonlarının da fiziksel stabilitesi 3 hafta süre ile 5±3 °C'de izlenmiştir (Tablo 4.55). Tazaroten yüklü transferzom (TZ TR) 3 hafta boyunca boyutta değişim olmamasına rağmen, başlangıçta dağılımı yüksek bulunmuştur (PDI >0,3) ve zamana bağlı olarak da artış göstermiştir (Tablo 4.55). Takrolimus yüklü transferzomun (TC TR) PDI değeri de 4 ay süresince oldukça fazla bir artış göstermiştir (Tablo 4.55). Tazaroten yüklü (TZ ET) ve takrolimus yüklü (TC ET) etozom fomülasyonlarında da hazırlandıktan 3 günden sonra faz ayrımı olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom fomülasyonları, bu etkin maddelerin transferzom ve etozomlarına göre daha iyi fiziksel stabilite

göstermiştir. Bu durumun transetozomlarda etanolün ve kenar aktivatörün birlikte kullanılmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Zeta potansiyel nano yapılı veziküllerin çok önemli bir parametresidir. Lipozomların yüzeyindeki net elektrik yükü; fiziksel stabiliteleri yanı sıra deri-vezikül arasındaki etkileşimlerini de etkileyebilmektedir. Bu nedenle, net yüzey yükünün varlığı lipozomları agregat oluşmasından korur (Guo ve ark. 2015). Dolaysı ile, daha büyük itici kuvvetlere sahip partiküller, agregat oluşturmaya daha az eğilim gösterir ve daha kararlı bir yapı oluşur. Genellikle, zeta potansiyel değeri < -30 mV veya > +30 mV olduğunda partiküler sistemler daha kararlı bir yapıya sahip olmaktadır (Sabeti ve ark. 2014).

Çalışmamızda hazırlanan bütün formülasyonlar negatif zeta potansiyel değeri vermiştir. Her iki etkin madde ile yüklü veziküllerin zeta potansiyeli değerinin; kenar aktivatörü tipine ve varlığına, fosfolipite, aynı zamanda etanol içeriğine bağlı olduğu düşünülmektedir (Tablo 4.56 ve 4.57).

Veziküllerin negatif zeta potansiyel değeri; fosfolipit olarak kulanılan fosfatidil kolinin 6 ile 6,7 arasında izoelektrik nokta (pI) ya sahip bir zwitterionik bileşik olması ile açıklanabilir (Cahin ve Kemp 1934). Çalışma koşullarında yaklaşık olarak formülasyonun pH'sı 7'dir, bu değerdeki pH izoelektrik noktadan biraz yüksek olduğu için fosfatidil kolin negatif bir yüke sahip olabilir. Ayrıca, etanol de net negatif yüzey yük sağlar; bu da elektrostatik itme kuvvetleri nedeniyle veziküllerin agregasyonunu önler. Bu nedenle, etanol içeren veziküller daha stabil olmaktadır (Jain ve ark. 2007). Touitou ve arkadaşları, etanolün veziküllerin yükünün pozitiften negatife dönmesine neden olduğunu göstermişlerdir (Touitou, Dayan ve ark. 2000). Çalışmamızda hazırlanan transetozomların negatif yükünün bu sebeplere bağlı olduğu düşünülmektedir.

Tazaroten yüklü Tween 80 ile hazırlanan transetozom ve transferzomlar (TZ TR) -1,09 ±1,549 ve -3,13±0,224 mV arasında zeta potansiyel değeri vermiştir (Tablo 4.56). Bu veriler, literatürdeki kayıtlı bulgular ile uyumludur (Song ve ark. 2012). Veziküllerin zeta potansiyelleri formülasyonlarında kullanılan yardımcı maddelere bağlıdır. Fiziksel olarak stabil bir süspansiyon elde etmek için ±30 mV zeta potansiyel değeri ideal kabul edilir. Ancak, bu değer sadece tek elektrostatik sabitleme durumunda geçerlidir (Radomska-Soukharev 2007). Kenar aktivatörü olarak Tween 80

kullanıldığında; veziküllerin daha düşük zeta potansiyel değeri vermesine rağmen, Tween 80'in nano sistemlere ek sterik bir stabilizasyon sağladığı da kayıtlıdır (Radomska-Soukharev 2007; Cattani ve ark. 2010; Bikkad ve ark. 2014; Savian ve ark. 2015). Sodyum kolat ile hazırlanan transetozomlar ise daha negatif zeta potansiyeli değeri göstermiştir (-7,27±0,531 ve -11,55±1,768) bu durum, sodyum kolatın anyonik yapısı ile açıklanabilir (White ve ark. 2007).

Takrolimus yüklü Tween 80 ile hazırlanan transetozom (TC 4-TW 1) formülasyonu ise -2,93±0,431 zeta potansiyel değeri vermiştir (Tablo 4.57). Diğer taraftan sodyum kolat ile hazırlanan transetozomlar -6,64±0,467 ile -13,9±1,120 mV aralığında değerler verdi (Tablo 4.57). Bu durum, Tween 80'in noniyonize karakteri ile açıklanabilir.

Özellikle, takrolimus yüklü transferzomun (TC SK) zeta potansiyel değeri -51,25±1,190 mV bulunmuştur (Tablo 4.57), bu formülasyon bileşiminde etanol içermediği için sodyum kolatın anyonik özelliğinin etkisinin daha belirgin olduğu düşünülmektedir (White ve ark. 2007). Diğer taraftan, zeta potansiyeli yüksek olmasına rağamen bu transferzom formülasyonu diğer sodyum kolat ile hazırlanan transetozomlara göre daha düşük fiziksel stabilite göstermiştir (Tablo 4.55). Bu durum da stabilitenin sadece zeta potansiyele bağlı olmadığını göstermektedir. Bu durumun etanoldan veya sürfaktanlardan kaynaklanan sterik stabilizasyon etkisine de bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Veziküllerdeki etkin maddelerin enkapsülasyon verimi iki yöntem ile hesaplanmıştır. Geri kazanım yönteminde; çözünmemiş etkin madde filtrasyon ile ayrıldıktan sonra veziküllerdeki miktarını hesaplamak için vezikülün yapısını bozundurularak etkin madde miktarı HPLC ile hesaplanmıştır (Denklem 3.3). Ultrafiltrasyon yönteminde ise; vivaspin tüpleri kullanılmıştır, vezikülün dış fazındaki yüklenmemiş etkin maddenin santrifüjleme etkisi ile tüpteki filtreden geçen miktarı HPLC yöntemi ile hesaplanmıştır (Denklem 3.4). Tazaroten %0,05 oranında veziküllere yüklenmiştir. Takrolimus %0,1 oranında veziküllere yüklenmiştir. Ultrafiltrasyon yöntemi ile bütün formülasyonlar için yüklenmeyen tazarotenin miktarı deteksiyon limitin altında kaldığı için etkin madde veziküllere çok yüksek yüklendiği şeklinde değerlendirilmiştir (Tablo 4.58). Her iki yöntem ile de veziküllerin enkapsülasyon etkinliği yüksek bulunmuştur (Tablo 58-Tablo 4.59).

Veziküllerin yüksek enkapsülasyon verimi; tazaroten ve takrolimusun çok lipofilik etkin maddeler (sırasıyla log P 5,96 ve 3,96) olmaları nedeniyle lipit matrise yüksek afinite göstermelerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Veziküllerin hazırlanması yönteminde de daha önce belirtildiği gibi, veziküllerin oluşturulması sırasında elde edilen ince film geniş bir yüzey alanın üzerine gerçekleşir, böylece veziküllerin tam hidratasyonu sağlanabilir ve enkapsülasyon etkinliği artabilir (Jain ve ark. 2003; Mahmood ve ark. 2014). Song ve arkadaşları geri kazanım yöntemi kullanılarak vorikonazolun (log P 1,82) transetomozlardan geri kazanımını yüksek bulmuşlardır (>%95) (Song ve ark. 2012). Zhang ve arkadaşları da terbinafin hidroklorür (log P 5,9) yüklü transferzom ve etozomunun enkapsülasyon etkinliğini ultrafiltrasyon yöntemi ile yüksek bulmuşlardır (>%99) (Zhang ve ark. 2012).

Ayrıca, enkapsülasyon veriminin yüksek olması aşağıdaki nedenler ile açıklanabilir: (i) Fosfatidilkolinin tazarotene göre ağırlık oranı 120:1 ile 60:1 arasında ve fosfatidilkolinin takrolimusa göre ağırlık oranı 60:1 ile 30:1 arasındadır, fosfolipidin etkin maddelere göre oranı çok yüksek olduğu için bu etkin maddeler üç farklı tipteki vezikül içinde tamamen enkapsüle edilmiş olabilir. (ii) Transetozomlar ve etozomların yüksek etanol oranına sahip olmaları, etkin maddelerin veziküler çekirdeği ve lipit çift tabakada daha fazla çözünürlüğü sağlamıştır (Touitou, Dayan ve ark. 2000; Touitou, Godin ve ark. 2000).

TEM analizleri elde edilen görüntüler; TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu transetozom fomülasyonları için sırası ile Şekil 4.14 ve 4.15'te gösterilmektedir. Transetozomlar nano boyutta ve homojen bir dağılım halinde görüntülenmiştir. Transetozomların yuvarlak, ancak tam olarak küresel bir şekle sahip olmadıkları da görülmektedir. Bu görüntüler literatürle uygumludur (Song ve ark. 2012; Guo ve ark. 2015). Transetozomların tam bir küre şeklinde olmaması, bileşimlerinde bulunan etanol ve yüzey aktif maddenin yüksek konsantrasyon olması ile açıklanabilir. Diğer araştırıcıların da vurguladığı gibi, veziküllerdeki sürfaktan veya etanolün varlığı lipit çift tabakanın bozulmasına da yola açmış olabileceği düşünülmektedir (Song ve ark. 2012; Guo ve ark. 2015).

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozom formülasyonlaının karakterizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra; seçilen transetozom formülasyonlarından her iki etkin maddenin *in vitro* koşullarda deriye penetrasyon çalışmaları yürütüldü. Tazaroten

yüklü “TZ 4-TW 1; TZ 3-TW 1; TZ 4-TW 1-20; TZ 5-TW 1; TZ 4-SK 1; TZ 4-TW 0,5; TZ 4-TW 1,33; TZ 6-SK 1” kodlu formüalsyonlar ile takrolimus yüklü “TC 4- TW 1; TC 4- SK 1; TC 3-SK 1; TC 4- SK 1,33; TC 4-SK 0,705; TC 3-SK 0,529; TC 5-SK 1,25” kodlu formüalsyonlar üzerinde bu çalışmalar gerçekleştirildi.

Tazaroten yüklü transetozomların *in vitro* penetrasyon açısından etkinliğini değerlendirilmesi için; tazarotenin ticari bir topikal preparatı Türkiye’de pazarında bulunmadığından kontrol olarak, tazarotenin propilen glikoldeki doymuş çözeltisi kullanıldı. Literatürde benzer şekilde topikal preparatı bulunmayan ve antifungal bir etkin madde olan vorikonazolun transetozom formülasyonlarından deriye penetrasyonu da propilen glikol çözeltisindeki ile karşılaştırılmıştır (Song ve ark. 2012). Bu amaçla; tazarotenin propilen glikoldeki çözünürlüğü çalışıldı ve 593,93±15,93 µg/ml olarak hesaplandı (Tablo 4.26). Veziküllere yüklenen tazaroten miktarı 500 µg/ml (%0.05) olduğu için; tazarotenin propilen glikoldeki miktarının transetozom formülasyonundakine çok yakın olduğu, dolayısı ile propilen glikoldeki doymuş çözeltisindeki termodinamik aktivitesinin transetozom formülasyonundakine yakın olduğu saptanmıştır.

Takrolimus yüklü transetozomların in vitro penetrasyon açısından etkinliğini değerlendirmek için ise, takrolimusun pazardaki merhem preparatı (Protopic® %0,1, *Astellas Pharma*) kontrol olarak kullanıldı.

Tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomların bileşiminde %30 oranında etanol bulunduğundan ve etanolün penetrasyon artırıcı etkisi de olduğundan; veziküler sistemin üstünlüğünü değerlendirmek ve deride en yüksek etkin madde birikimi sağlayan transetozom formülasyonları (tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 ve takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu) ile karşılaştırmak amacı ile; tazaroten ve takrolimusun %30’luk hidroetanolük doymuş çözeltisi de kontrol olarak kullanıldı. Bu amaçla, her iki etkin maddenin %30’luk hidroetanolik çözeltisindeki doymuş çözünürlüğü tazaroten için 2,771±0,376 µg/ml ve takrolimus için 315,02±17,26 µg/ml saptanmıştır (Tablo 4.26 ve Tablo 4.27).

Ayrıca, transetozom formülasyonları ile tazaroten ve takrolimusun deriden geçişi, diğer veziküler sistemler olarak transferzom ve etozom formülasyonları ile de karşılaştırıldı. Bunun için; her iki etkin madddenin kalan deride en yüksek birikim sağlayan transetozom formülasyonlarının (TZ 4-TW 1 kodlu tazaroten yüklü ve TC 4-

SK 1 kodlu takrolimus yüklü transetozomlar) bileşimleri ile benzer olarak transferzom (TZ TR ve TC TR) ve etozom (TZ ET ve TC ET) formüasyonları da hazırlandı (Tablo 4.25).

İn vitro deriye penetrasyon çalışmaları Franz difüzyon hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Penetrasyon çalışmalarında insan derisi ile yapı ve kalınlık açısından benzerliği nedeniyle uygun bir model olan (Sullivan ve ark. 2001) domuz derisi kullanıldı. Bir kesim evinden sağlanan domuz derisinin dorsal (sırt) bölgesine ait deri parçaları subkütan yağ tabakası temizlendikten sonra, deri üzerindeki kıllar bir cerrahi makas yardımı ile uzaklaştırıldı. Yukarıda belirtilen bütün formülasyonlar difüzyon hücrelerinin donör fazına uygulanmasının ardından 24 saat sonunda etkin maddelerin derinin tabakalarındaki birikimi izlendi. Süre sonunda reseptör fazından numune alındıktan sonra deri parçaları Franz difüzyon hücrelerinden sökülerek, deri yüzeyinde kalan formülasyonun fazlası kağıt havlu ile silerek uzaklaştırıldı.

Etkin maddelerin deriye penetrasyonunun incelenmesi amacı ile bant ile soyma yöntemi kullanıldı. Bant ile soyma yöntemi (*tape stripping*), kozmetik ve dermatolojik formülasyonların kalitesi ve etkililiğinin değerlendirilmesi için basit ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde deri yüzeyine ardışık olarak yapıştırılarak kaldırılmış olan bantlar hem korneositler ve penetre olan etkin madde miktarı hakkında, hem de etken maddelerin *stratum corneum*'un farklı derinliğindeki dağılımı ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Bu nedenle, bant ile soyma tekniği topikal uygulanan maddelerin biyoyararlanımını incelemek için kullanılır (Escobar-Chávez ve ark. 2008; Lademann ve ark. 2009; Wiedersberg ve Nicoli 2012 p. 109-127). Bant ile soyma tekniği kullanılarak topikal formülasyonlara içeren penetrasyon arttırıcıların ve farklı formülasyon tiplerindeki etken maddelerin geçişi ve deride birikimleri de incelenmektedir (Gürbüz ve ark. 2016; Erdal ve ark. 2016).

Çalışmamızda, bantlar (Scotch Book Tape, 3M) 3,8x4 cm olarak kesilerek hazırladı ve formülasyon uygulandıktan sonra formülasyonun fazlası arındırıldıktan sonra ardışık olarak, deri yüzeyinde formülasyonla temas eden kısım 20 kez bant ile soyularak *stratum corneum* tabakası uzaklaştırıldı (Erdal ve ark. 2014, Gürbüz ve ark. 2015; Erdal ve ark. 2016). Bant ile soyma işleminden sonra, bantlardaki etken maddenin ekstraksiyonu için sırası ile uzaklaştırılan her beş bant bir tüpe konuldu ve üzerlerine 10 ml asetonitril (Lapteva, Mondon ve ark. 2014; Yu ve ark. 2015) ilave edildi. Kalan deri

parçaları (canlı epidermis+dermis) çok küçük parçalara kesilerek ayrı bir tüpe alındı üzerlerine 5 ml asetonitril ilave edildi ve ekstraksiyon işlemi için tüpler çalkalandı. Süre sonunda tazaroten için, her 10 bantın ekstrakte edildiği çözeltiler birer tüpte birleştirilerek, çözeltilerdeki etkin madde miktaralarının üst ve alt *stratum corneum*'daki birikimi temsil ettiği farz edildi. Takrolimus için ise bütün bantların ekstrakte edildiği çözeltiler bir tüpte birleştirilerek, çözeltilerdeki etkin madde miktarlarının tüm *stratum corneum*'daki birikimi temsil ettiği farz edildi. Böylece bantlardaki miktar *stratum corneum*'daki biriken etkin madde miktarı olarak kantitatif saptandı. Kalan derinin ekstraksiyonun yapıldığı tüpteki etkin madde miktarı da; diğer deri tabakalarındaki (canlı epidermis+dermis) birikimi olarak kantitatif saptandı.

Derinin geçirgenliği açısından, *stratum corneum* ana bariyeri oluşturur. Diğer kalan tabakalar (canlı epidermis ve dermis) da deri hastalıklarında etkin maddelerin taşınması açısından önemli hedef bölgelerdir (Walters ve Roberts 2002; Benson 2012). Çalışmamızda, psoriazis tedavisi açısından tazaroten ve takrolimusun *stratum corneum* bariyerini aşarak, derinin hedef tabakalarında (canlı epidermis ve dermis) daha fazla birikimini sağlayan formülasyonlar daha başarılı olarak seçilmiştir.

Çalışmamızda, hem tazaroten hem takrolimus yüklü bütün formülasyonlar ile kontrollerin deriye uygulanmasını takiben 24 sonunda reseptör fazdan alınan numunelerinde her iki etkin maddenin miktarı MTL altında kaldığı için ihmal edilir olarak kabul edildi. Bu durum, tazaroten ve takrolimusun uygulandıkları formüalsyonlar ile derinin hedef bölgelerinde lokalize olmasının bir göstergesi olarak yorumlanmıştır.

Tazaroten yüklü transetozomlar deriye uygulandıktan sonra; kontrol amaçlı propilen glikoldeki doymuş çözeltisi ile elde edilen miktarı ile karşılaştırıldığında; bütün transetozom formülasyonlarından tazarotenin deriye penetrasyonu, canlı epidermis+dermis tabakasındaki birikimi açısından anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.19). Çalışmamızda, 24 saat *in vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda doymuş propilen glikol çözeltisinden deriye geçen ve üst ve alt *stratum corneum*'da bulunan tazaroten miktarı sırası ile 0,813±0,186 µg/cm^2 ve 0,176±0,031 µg/cm^2 ve canlı epidermis+dermis tabakasındaki miktarı 0,398±0,086 µg/cm^2 olarak saptanırken, transetozom formülasyonlarının uygulanmasını takiben üst ve alt *stratum corneum*'daki tazaroten miktarları sırası ile 1,027±0,259-2,199±0,718 µg/cm^2 ve 0,218±0,014-0,720±0,279 µg/cm^2, canlı epidermis+dermis tabakasında 1,106±0,122-3,615±0,804

µg/cm^2 olarak saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Tablo 4.60 ve 4.61'de ve bu sonuçlara ait karşılaştırmalı grafikler Şekil 4.16 ile Şekil 4.19 aralığında verilmiştir.

Tazarotenin deride canlı epidermis+dermis tabakasındaki birikimi en yüksek penetrasyonu %4 fosfatidil kolin, kenar aktivatörü olarak %1 Tween 80 ve %30 etanol içeren TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonu ile sağlanmıştır. Bu formülasyon ile özellikle canlı epidermis+dermis tabakasında lokalize olan tazarotenin miktarının kontrole göre (doymuş propilen glikol çözeltisi) yaklaşık dokuz kat daha fazla bulunmuştur ($p<0,05$). Ayrıca TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyon ile, epidermis+dermis tabakasında tazarotenin birikimi diğer transetozomlar ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.19). Bu transetozom formülasyonun üst ve alt *stratum corneum*'daki miktarının ise diğer transetozom formülasyonlarına göre yüksek olmadığı saptanmıştır (Şekil 4.18). Bu durum, TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonu ile tazarotenin *stratum corneum* bariyerini aşma yeteniğin daha yüksek olması şeklinde açıklanmış ve derinin daha alttaki hedef tabakalarına (canlı epidermis+dermis) ulaşması açısından etkin bulunmuştur.

TZ 4-TW 1 kodlu transetozomun %4 fosfatidil kolin, kenar aktivatörü olarak %1 sodyum kolat ve % 30 etanol içeren TZ 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonuna göre, canlı epidermis+dermis yaklaşık 2 kat daha fazla tazaroten birikimi sağladığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.19). Bu bulguya göre, kenar aktivatörü olarak Tween 80 içeren transetozomlar (TZ 4-TW 1) sodyum kolat ile hazırlananan formülasyona göre (TZ 4-SK 1) göre tazarotenin deriye penetrasyonunu anlamlı artırmıştır. Bu durum; tazarotenin Tween 80'e afinitesinin yüksek olması nedeniyle çözünürlüğünü arttırması ile açıklanabilmektedir (Patel ve ark. 2010; Nasr ve Abdel-hamid 2016). Veziküler sistemlerde kenar aktivatörü olarak kullanılan surfaktaların HLB değerinin etkin maddelerin deriye penetrasyonunda kenar aktivatörünün HLB değerinin etkisinin olabileceği literatürde gösterilmiştir (El Zaafarany ve ark. 2010, Lei ve ark. 2013). Tween 80'nın HLB değerinin (15) sodyum kolatın HLB değerine (18) göre daha yüksek olması nedeniyle, aşırı lipofilik karakterdeki tazarotenin Tween 80'e afinitesinin sodyum kolata göre daha fazla olabilmesi ile de açıklanabileceği düşünülmektedir.

Transetozomlarda fosfolipit olarak farklı konsantrasyonlarda (%3, 4 ve 5) Phospholipon 90 G ve aynı oranda kenar aktivatörü olarak Tween 80 içeren

transetozomlardan (TZ 3-TW 1, TZ 4-TW 1, TZ 5-TW 1 kodlu transetozomlar) tazarotenin deriye penetrasyonu incelendiğinde; %4 Phospholipon 90 G ile hazırlanan transetozom (TZ 4-TW 1) ile canlı epidermis+dermis'te lokalize olan tazaroten miktarı %3 (TZ 3-TW 1) ve % 5 (TZ 5-TW 1) fosfolipit içerenlere göre sırası ile 1,86 ve 2 kat daha yüksek bulunmuştur (Tablo 4.61) ($p<0,05$). Sonuç olarak, tazaroten yüklü transetozomlar için bileşenlerinde %4 Phospholipon 90 G kullanılması deriye penetrasyon açısından uygun bulunmuştur. Literatürde veziküler sistemin hazırlanmasında fosfolipit olarak Phospholipon 90 G'nin bu oranda kullanıldığı görülmektedir (Montanari ve ark. 2007; Chen ve ark. 2014). Benzer şekilde, kenar aktivatörü olarak sodyum kolat kullanıldığında da, %4 oranında Phospholipon 90 G içeren transetozomlar (TZ 4-SK 1) ile %6 ile hazırlanana göre (TZ 6-SK 1) tazarotenin canlı epidermis+dermis'te lokalizasyonunun 1,5 kat daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Transetozomlarda kullanılan kenar aktivatörü oranının (%05, 1, 1,33) etkisini değerlendirmek için aynı oranda (%4) Phospholipon 90 G içeren TZ 4-TW 0,5; TZ 4-TW 1 ve TZ 4-TW 1,33 kodlu transetozomlardan tazarotenin deriye penetrasyonu incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, %1 Tween 80 içeren transetozom (TZ 4-TW 1) ile %0,5 (TZ 4-TW 0,5) ve %1,33 (TZ 4-TW 1,33) Tween 80 içeren transetozomlara göre canlı epidermis+dermis'te lokalize olan tazaroten miktarı sırası ile 2,7 ve 3 kat yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Veziküllerde çifte lipit tabakalara sürfaktanların eklenmesinin bu sistemlerin yapılarını daha akışkan bir hale getirdiği öne sürülmektedir. Bu sürfaktan içeren veziküller etkin maddelerin deriye daha yüksek penetrasyonunu sağlamaktadır. Ancak yüksek sürfaktanın konsantrasyonunun optimum değerini aşması bu akışkan lipozomların karışık misellere dönüşmesine yol açabilmektedir. Bu durumda da etkin maddenin deriye penetrasyonu azalabimektedir (El Maghraby ve ark. 2004). Dolayısı ile, transetozomolarda sürfaktan konsantrasyonunun (Tween 80) %0,5'ten %1'e artırılması ile tazarotenin derideki birikiminin artması transetozomların akışkanlığını artması ile açıklanabilir. Sürfaktan konsantrasyonu %1,33'e çıkartıldığında tazarotenin derideki birikiminin azalması da karışık misel yapısı gibi diğer yapıların da varlığına da bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Bu veriler ile; tazarotenin derideki hedef bölgede (canlı epidrmis+dermis) birikimini en fazla TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonunun sağladığı saptanmıştır. TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonudan tazarotenin deriye

penetrasyonu, etanol içermeyen transferzom (TZ TR) ve %20 etanol içeren transetozom (TZ 4-TW 1-20) formülasyonu ile karşılaştırıldı. Elde edilen bulgular Tablo 4.60 ve Tablo 4.61'de ve karşılaştırlmalı grafikler Şekil 4.20 ile 4.21'de verilmiştir. 24 saat *in vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda, TZ TR kodlu transferzom formülasyonundan tazarotenin üst ve alt *stratum corneum*'daki birkimleri sırası ile 2,137±0,265 µg/cm^2 ve 0,254±0,046 µg/cm^2; canlı epidermis+dermis'te 0,950±0,293 µg/cm^2 olarak saptanırken, TZ 4-TW 1 kodlu seçilen en iyi transetozm için bu değerler alt ve üst *stratum corneum*'da 1,281±0,225 µg/cm^2 ve 0,228±0,074 µg/cm^2, canlı epidermis+dermis'te lokalize olan tazaroten miktarı 3,615±0,804 µg/cm^2 bulunmuştur. Özellikle, canlı epidermis+dermis tabakasında lokalize olan tazaroten miktarı TZ TR kodlu transferzome göre, TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonu ile yaklaşık 3,8 kat daha fazla bulunmuştur ($p<0,05$). 24 saat *in vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda, TZ 4-TW 1-20 kodlu transferzom formülasyonundan tazarotenin üst ve alt *stratum corneum*'daki birkimleri sırası ile üst ve alt *stratum corneum*'da 2,199±0,718 µg/cm^2 ve 0,508±0,13 µg/cm^2; ve canlı epidermis+dermis'te lokalize olan tazaroten miktarı 1,930±0,093 µg/cm^2 olarak saptanmıştır. Aynı şekidle canlı epidermis+dermis tabakasında lokalize olan tazaroten miktarı TZ 4-TW 1-20 kodlu transferzome göre, TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonu ile yaklaşık 1,9 kat daha fazla bulunmuştur ($p<0,05$).

Sonuç olarak; transetozomlardaki etanol konsantrasyonun tazarotenin derideki birikimini anlamlı olarak etkilediği görülmüştür. Bu durum; transetozomlardaki yüksek etanol konsantrasyonun vezikül membranının ara yüzey gerilimini azaltarak membran yapısına elastikiyet sağlaması ile açıklanabilir. Benzer şekilde, etanolün vezikül membranı üzerindeki akışkanlaştırıcı etkisi literatürde kayıtlıdır (Touitou ve ark. 2001; Jain ve ark. 2007). Ayrıca etanol, *stratum corneum* lipit moleküllerinin polar baş grupları ile etkileşerek lipitlerin erime derecesini düşürür (Verma ve Pathak 2010; Garg ve ark.2017).

Deride en yüksek tazaroten lokalizasyonunu sağlayan TZ 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonundan tazarotenin deriye penetrasyonu, aynı zamanda %30 etanol içeren etozom (TZ ET) ve tazarotenin %30 hidroetanolik doymuş çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. Bulgular, Tablo 4.61'de ve karşılaştırmalı grafikler Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de verilmiştir. TZ ET kodlu etozom ile deride biriken tazarotenin miktarları;

üst ve alt *stratum corneum*'da sırası ile 0,723±0,152 µg/cm^2 ve 0,169±0,043 µg/cm^2 ve epidermis+dermis'te lokalize olan miktarı 1,331±0,216 µg/cm^2 olarak saptanırken, tazarotenin %30 hidroetanolik doymuş çözeltisi ile biriken miktarları; üst ve alt *stratum corneum*'da sırası ile 0,140±0,027 µg/cm^2 ve 0,054±0,007 µg/cm^2 ve canlı epidermis+dermis'te ise 0,158±0,022 µg/cm^2 olarak bulunmuştur. Özellikle hedef dokuda (canlı epidermis+dermis'te) lokalize olan tazarotenin miktarı TZ 4-TW 1 kodlu transetozom ile, TZ ET kodlu etozom ve %30 hidroetanolik doymuş çözeltisine göre sırası ile yaklaşık 2,7 ve 23 kat fazla bulunmuştur ($p < 0,05$). Tazarotenin doymuş %30 hidroetanolik çözeltisinden geçişinin düşük olması, muhtemelen tazarotenin bu sistemdeki çözünürlüğünün çok düşük olmasından dolayı (2,771±0,376 µg/ml) etkin maddenin bu sistemdeki termodinamik aktivitesinin düşük olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, tazarotenin transetozom formülasyonu ile deriye geçişi ve hedef bölgelerindeki (canlı epidermis+dermis) biriken miktarı açısından etozom ve transferzomuna göre daha yüksek bulundu. Bu durum tazarotenin aşırı lipofilik yapısı nedeniyle formülasyon bileşenlerindeki sürfaktan ve etanolün bir arada kullanılması ile açıklanabilir. Benzer şekilde, aşırı lipofilik maddelerin deriden geçişi için transetozom formülasyonları etozom ve transferzomlara göre üstünlük sağladığı literatürde gösterilmiştir (Song ve ark. 2012; Guo ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Garg ve ark. 2017).

Çalışmamızda, takrolimus yüklü transetozom formülasyonları deriye uygulandıktan sonra kontrol olarak ticari merhem preparatı (Protopic®) ile elde edilen derideki birikim miktarları karşılaştırıldığında; TC 5-SK 1,25 dışındaki diğer bütün transetozom formülasyonlarından takrolimusun deriye penetrasyonu hedef bölgedeki (canlı epidermis+dermis tabakasındaki) birikimi açısından anlamlı derecede farklı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.25). Elde edilen sonuçlar Tablo 4.62 ve 4.63'de ve bu sonuçlara ait karşılaştırmalı grafikler ise Şekil 4.23 ile Şekil 4.25'te verilmiştir.

24 saat *in vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda Protopic® ile deriye geçen ve canlı epidermis+dermis tabakasında lokalize olan takrolimus miktarları *stratum corneum*'da 276,5±181,4 ng/cm^2 ve epidermis+dermis tabakasında derideki miktar 1550,0±56,0 ng/cm^2 olarak saptanırken, transetozom formülasyonları için bu değerler *stratum corneum*'da 755,4±181,7-2358,8±575,1 ng/cm^2 ve canlı epidermis+dermis

tabakasında 1629,3±273,6-4816,3±328,3 ng/cm^2 olarak saptanmıştır (Tablo 4.62-Tablo 4.63).

Takrolimusun canlı epidermis+dermis tabakasına en yüksek penetrasyonu %4 fosfatidil kolin, kenar aktivatörü olarak %1 sodyum kolat ve %30 etanol içeren TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonu ile sağlanmıştır. Bu formülasyon ile hedef bölgedeki canlı epidermis+dermis tabakasında takrolimus birikimi, kontrole göre (Protopic®) yaklaşık olarak 3 kat daha fazla olmuştur ($p<0,05$). Diğer transetozom formülasyonları ile karşılaştırıldığında da bu formülasyon ile etkin maddenin canlı epidermis+dermis tabakasındaki birikimi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4.25).

TC 4-SK 1 kodlu transetozomun %4 fosfatidil kolin, kenar aktivatörü olarak %1 Tween 80 ve % 30 etanol içeren TC 4-TW 1 kodlu transetozom formülasyonuna göre, canlı epidermis+dermis yaklaşık 1,4 kat daha fazla takrolimus birikimi sağladığı saptanmıştır ($p<0,05$) (Şekil 4.25). Bu bulguya göre, kenar aktivatörü olarak sodyum kolat içeren transetozom (TC 4-SK 1) Tween 80 ile hazırlanan (TC 4-TW 1) göre takrolimusun deriye penetrasyonunu artırmıştır. Bu durum, takrolimusun sodyum kolat'a afinetisinin daha fazla olması nedeniyle olabilir. Sodyum kolat, bir makrolit olan takrolimusa benzer bir steroit yapıya sahip bir sürfaktan moleküldür (Subuddhi ve Mishra 2007; Lei ve ark. 2013). Muhtemelen veziküllerdeki çifte lipit tabakaya yerleşmek için takrolimus ve sodyum kolat arasında bir rekabet söz konusu olmaktadır (Lei ve ark. 2013). Böylece, takrolimusun veziküllerden penetrasyonun arttığı düşünülmektedir.

Transetozomlarda fosfolipit olarak farklı konsantrasyonlarda (%3 ve 4) Phospholipon 90 G ve aynı oranda kenar aktivatörü olarak sodyum kolat içeren transetozomlardan (TC 3-SK 1 ve TC 4-SK kodlu transetozomlar) takrolimusun deriye penetrasyonu incelendiğinde; %4 Phospholipon 90 G ile hazırlanan transetozom (TC 4-SK 1) ile canlı epidermis+dermis'te lokalize olan takrolimus miktarı %3 (TC 3-SK 1) fosfolipit içerene göre 1,7 kat daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Sonuç olarak, takrolimus yüklü transetozomaların %4 Phospholipon 90 G ile hazırlandığında deriye penetrasyonlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Montanari ve ark. 2007; Chen ve ark. 2014). Ayrıca, %5 fosfolipit, %1,25 sodyum kolat içeren TC 5-SK 1,25 kodlu transetozomdan takrolimusun derinin hedef tanakasındaki birkiminin kontrol

formüalsyonu (Protopic®) ile benzer olduğu, dolayısı ile bir üstünlük sağlamadığı bulunmuştur.

Takrolimus yüklü transetozomlarda kullanılan kenar aktivatörü oranının (%0,705, 1, 1,33) etkisini değerlendirmek için aynı oranda (%4) Phospholipon 90 G içeren TC 4-SK 0,705; TC 4-SK 1 ve TC 4-SK 1,33 kodlu transetozomlardan (fosfolipit:sodyum kolat oranı sırasıyla 85:15, 80:20, 75:25) takrolimusun deriye penetrasyonu incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre, %1 sodyum kolat içeren transetozomdan (TC 4-SK 1) derideki hedef bölgede lokalize olan takrolimus miktarı diğer %0,705 (TC 4-SK 0,705) ve %1,33 (TC 4-SK 1,33) sodyum kolat içeren iki transetozom formülasyonuna göre sırası ile 1,43 ve 1,44 kat daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.25) ($p<0,05$). Bu durum da tazaroten yüklü transetozomlarda açıkladığımız gibi; sürfaktanın belli bir konsantrasyonun üstünde karışık misellerin oluşmasına ve veziküllün taşıdığı ilacın deriye penetrasyonu azalmasına yol açması ile açıklanabilir. Dolayısı ile, yüksek konsantrasyonda sodyum kolat içeren formülasyonda veziküllerin ve karışık misellerin bir arada bulunması etkin maddenin deriye penetrasyonunu azaltabilmektedir (Almog ve ark. 1986; El Maghraby ve ark. 2000). Bir diğer neden ise, sodyum kolatın takrolimuse benzer bir steroit yapıya sahip olmasına bağlı olarak sodyum kolatın veziküllerde çifte lipit tabakasında takrolimusun yerini alabilmesidir. Bu iki madde lipit tabakada yerleşmek için yarışır, bu yarışma sodyum kolatın yüksek konsantrasyonlarında daha belirgin olabildiği için takrolimusun deriye penetrasyonu azalabilmektedir (Almog ve ark. 1986; El Maghraby ve ark. 2000).

Takrolimusun derideki hedef bölgede (canlı epidrmis+dermis) birikimini en fazla TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonunun sağladığı saptanmıştır. TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonundan takrolimusun deriye penetrasyonu, etanol içermeyen transferzom (TC TR) formülasyonu ile karşılaştırıldı. Elde edilen bulgular Tablo 4.63'te ve karşılaştırlmalı grafik Şekil 4.26'da verilmiştir. 24 saat *in vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda, TC TR kodlu transferzom formülasyonundan takrolimusun *stratum corneum*'daki birikimi 460,9±17,7 ng/cm^2 ve canlı epidermis+dermis tabakasındaki miktar 1739,0±153,2 ng/cm^2 olarak saptanırken, TC 4-SK 1 kodlu formülasyon için *stratum corneum*'da 2048,8±525,1 ng/cm^2 ve canlı epidermis+dermis tabakasında 4816,3±328,3 ng/cm^2 bulunmuştur. Özellikle, TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonu ile canlı epidermis+dermis tabakasında lokalize olan

takrolimus miktarı TC TR kodlu transferzoma göre yaklaşık 2,77 kat daha fazla bulunmuştur ($p<0,05$). Dolayısı ile; transetozomlardaki etanol konsantrasyonun takrolimusun da derideki birkimini anlamlı olarak artırdığı görülmüştür. Bu durum; tazaroten yüklü transetozomlarda da açıklandığı gibi yüksek etanol konsantrasyonun vezikül yapısına elastikiyet sağlaması ile açıklanabilir (Touitou ve ark. 2001; Jain ve ark. 2007). Ayrıca, etanolün penetrasyon arttırıcı etkisi de konsantrasyona bağlı olarak olabilmektedir (Garg ve ark. 2017).

Deride en yüksek takrolimus lokalizasyonunu sağlayan TC 4-SK 1 kodlu transetozom formülasyonundan takrolimusun deriye penetrasyonu, aynı zamanda %30 etanol içeren etozom (TC ET) ve takrolimusun %30 hidroetanolik doymuş çözeltisi ile karşılaştırılmıştır. Bulgular, Tablo 4.63'de ve karşılaştırmalı grafik Şekil 4.26'da verilmiştir. TC ET kodlu etozom ile deride biriken takrolimusun miktarı; *stratum corneum*'da 1155,5±343,8 ng/cm^2 ve epidermis+dermis'te lokalize olan miktarı 2130,5±631,4 ng/cm^2 olarak saptanırken, takrolimusun %30 hidroetanolik doymuş çözeltisi ile biriken miktarları; *stratum corneum*'da 3957,3±132,6 ng/cm^2 ve canlı epidermis+dermis'te ise 2822,2±3,6 ng/cm^2 olarak bulunmuştur. Özellikle hedef dokuda (canlı epidermis+dermis'te) lokalize olan takrolimus miktarı TC 4-SK 1 kodlu transetozom ile, TC ET kodlu etozom ve %30 hidroetanolik doymuş çözeltisine göre sırası ile yaklaşık 2,26 ve 1,7 kat fazla bulunmuştur ($p<0,05$).

Takrolimusun %30 hidroetanolik doymuş çözeltisi ile özellikle *stratum corneum*'daki birikimin fazla bulunması, takrolimusun bu sistemdeki çözünürlüğünün yüksek (315,02±17,26 µg/ml) olmasına bağlı olarak etkin maddenin sistemdeki termodinamik aktivitesinin yüksek olması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, takrolimusun transetozom formülasyonu ile deriye geçişi ve hedef bölgelerindeki (canlı epidermis+dermis) biriken miktarı açısından etozom ve transferzomuna göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum; takrolimusun çok lipofilik yapısı nedeniyle formülasyon bileşenlerindeki sürfaktan ve etanolün bir arada kullanılması ile açıklanabilir. Benzer şekilde, aşırı lipofilik maddelerin deriden geçişi için transetozom formülasyonları etozom ve transferzomlara göre üstünlük sağladığı literatürde gösterilmiştir (Song ve ark. 2012; Guo ve ark. 2015; Ma ve ark. 2015; Garg ve ark. 2017).

Elde edilen bulgularadan görüldüğü gibi, tazaroten ve takrolimusun derinin hedef bölgesindeki birikimi kontrol formülasyonları/çözeltileri ile karşılaştırıldığında, transetozom formülasyonları ile önemli ölçüde arttırılmıştır. Bu verilere dayanarak, transetozomların *stratum corneum* ve derinin daha derin tabaklarında her iki etkin maddenin birikimini arttırmak için hedeflenen etkiye sahip oldukları gösterilmiştir. Ayrıca, transetozomların, transferzomlar ve etozomlar ile kıyaslandığında özelllikle lipofilik moleküller olan tazaroten ve takrolimusun dermal verilişi için umut verici bir taşıyıcı sistem olduğu gösterilmiştir.

IR spektroskopisi *stratum corneum*'un bariyer özelliği daha iyi anlaşılması için yaygın olarak kullanılan biyofiziksel tekniktir (Tanojo ve ark 1997, Mendelsohn ve ark. 2006). Tranzetozmların ve kontrol formülasyonların *stratum corneum* hücrelerarası lipitler üzerinde gösterdikleri etkilerini araştırmak için 24 saatlık in vitro penetrasyon çalışmalarından sonra ATR-FTIR spektroskopisi ile analizler gerçekleştirildi.

Yöntem 3.2.15'te anlatıldığı gibi; in vitro penetrasyon çalışması ile 24 saat sonra CH_2 simetrik (2850 cm^{-1}) ve asimetrik (2920 cm^{-1}) gerilme bantları üzerinde oluşan değişiklikler tazaroten ve takrolimus sırasıyla Tablo 4-64 ve 4-65'te gösterildi. Kontrol deriye ait ATR-FTIR spektrumu Şekil 4-28'de gösterildi. Tazaroten yüklü transetozom ve kontrol formülasyonlarının uygulanmasının 24 saattan sonra deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumları sırası ile Şekil 4-29 ile Şekil 4-40 aralığında verildi. Takrolimus yüklü transetozom ve kontrol formülasyonlarının uygulanmasının 24 saattan sonra deri yüzeyinden alınan ATR-FTIR spektrumları sırası ile Şekil 4-41 ile Şekil 4-51 aralığında verildi. Ayrıca tazaroten ve takrolimus için asimetrik ve simetrik gerilme bantların karşılaştırmalı grafiği tazaroten yüklü formülasyonlar için Şekil 4.52 ve Şekil 4.53'te ve takrolimus yüklü olanlar için Şekil 4.54'de ve Şekil 4.55 verildi.

Stratum corneum'un üzerinde yapılan spektroskopik çalışmalar ile ilgili en çok bilgi veren hidrofobik alkil zincirlerin lipit absorbanslarıdır. *Stratum corneum*'da bulunan hücrelerarası lipitlerin alkil zincirin düzeninde sıcaklığa bağlı olarak oluşabilen bozulma tipleri; CH_2 asimetrik (2920 cm^{-1}) ve simetrik (2850 cm^{-1}) gerilme bantlarına ait dalga numaralarının daha yüksek değerlere kaymasıdır (blue shift) (Stuart ve ark. 2004; Zhang ve ark. 2016).

Çalışmamızda kontrol derisinden elde edilen spektrumun asimetrik ve simetrik gerilme bantlarına ait dalga numaraları sırası ile 2918,605±0,092 cm^{-1} ve 2850,51± 0,057 cm^{-1} olarak saptanmıştır, bu değerler lipit çifte tabakanın belli bir düzene sahip olduğuna işaret etmektedir (Harisson ve ark. 1996; Jadoul be ark. 1996).

Tazarotenin derinin hedef tabakaları canlı epidermis+dermis tabakasındaki en yüksek birikimini sağlayan TZ 4-TW 1 kodlu transetozmunun kontrol deriye göre asimetrik ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında sırasıyla 4 cm^{-1}'lik ve 2 cm^{-1}'lik bir artışa yol açtığı saptanmıştır. Bu durumda; TZ 4-TW 1 kodlu transetozmun tazarotenin deriye penetrasyonu ve birikimini artırmasının, *stratum corneum'*daki lipitlerin yapısal düzenini bozarak etki etmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca tazaroten yüklü transetozom, transferozum, etozom formülasyonları ile propilen glikoldeki doymuş çözeltisi ve %30 hidroetanolik doymuş çözeltisinin asimetrik ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında kontrol derisine göre sırasıyla 1-4 cm^{-1}'lik ve 1-2 cm^{-1}'lik aralığında artış saptanmıştır. Bu sonuçlar, hazırlanan veziküller sistemlerin etkin maddelerin deriye taşınabilmesi ve *stratum corneum* bariyerini aşabilmesi için rol oynadığını göstermektedir.

Takrolimus için derinin hedef tabakaları olan canlı epidermis+dermis tabakasındaki en yüksek birikimini sağlayan TC 4-SK 1 kodlu transetozmun asimetrik ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında kontrol deriye göre sırasıyla 4 cm^{-1}'lik ve 2cm^{-1}'lik bir artışa yol açtığı saptanmıştır. Bu durumda; TC 4-SK 1 kodlu transetozmun takrolimusun deriye penetrasyonu ve birikimini artırmasının *stratum corneum* lipitlerinin yapısal düzenini bozmasına bağlı olduğunu düşünülmektedir.

Buna karşılık Protopic® formülasyonu ile deri lipitlerine ait asimetrik gerilme bantı dalga numarasında, kontrol deriye göre 1 cm^{-1}'lik bir artış saptanırken, simetrik bantında çok az bir artış veya hiç artış olmadığı görülmüştür. Ayrıca takrolimus yüklü transetozom, transferozom, etozom formülasyonları ile ve %30 hidroetanolik doymuş çözeltisinin asimetrik ve simetrik gerilme bantlarının dalga numaralarında kontrol deriye göre sırasıyla 2,89-4 cm^{-1}'lik ve 1-1,83 cm^{-1}'lik aralığında artış olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, hazırlanan veziküller sistemlerin etkin maddelerin deriye taşınabilmesi ve *stratum corneum* bariyerini aşabilmesi için nasıl rol oynadığını göstermektedir.

Konfokal lazer mikroskobu CLMS ile etkin madde yerine boya maddesi/fluoresans veren maddeler ile yüklenen veziküler taşıyıcı sistemlerin derinin farklı tabakalarında görüntülenebilmektedir (Ma ve ark. 2015; Gürbüz ve ark. 2015; Kahraman ve ark. 2016). Etkin madde yerine lipofilik bir fluoresan madde olan Nil Kırmızısı (log P: 3,8) (Mérian ve ark. 2012) yüklü (1µg/ml) TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu transetozomların uygulandığı deri parçaları 24 saat sonunda Franz difüzyon hücrelerinden çıkarıltı. Daha sonra bu deri örneklerinden Kriyotom cihazı kullanılarak 20 µm'lik dikey kesit ve 20 µm, 150 µm ve 400 µm lik yatay kesit alınarak konfokal mikroskopta incelendi ve transetozomların derinin farklı tabakalarındaki dağılımları görüntülendi. Transetozomlar ile kıyaslamak için kontrol olarak Nil Kırmızısı'nın PBS 7,4'deki çözeltisi (1µg/ml) kullanılmıştır.

TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu transetozmların ve kontrolun deriden geçişi 24 saat uygulandıktan sonra deriye ait dikey ve yatay kesitlerinin görüntüleri Şekil 4.56 - Şekil 4.62'de verilmiştir. Şekil 4.59, TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu Nil Kırmızısı yüklü transetozm formülasyonları ve kontrolun arasında dikey kesite ait karşılaştırmasını göstermektedir. TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 formülasyonlara ait CLMS görüntüleri kontrole göre derinin daha derin tabakalarına kadar (dermis) boyanın penetrasyonunun arttığını göstermektedir, oysa kontrole ait görüntüler incelendiğinde Nil Kırmızısı'nın deri yüzeyinde kaldığı ve canlı epidermis ve dermis tabakalarında solgun bir görüntü verdiği görülmektedir. Yatay kesitler ile elde edilen görüntüler de dikey kesitlerin sonuçlarını desteklemektedir (Şekil 4.60, Şekil 4.61 ve Şekil 4.62). TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu formülasyonlar kontrole göre daha yoğun boya rengi vermiştir ve bu yoğunluğun şiddetinin alınan kesitlerde, 20 µm > 150 µm > 400 µm olarak azalmaktadır. Bu da transetozomların veziküler ilaç taşıyıcı sistem olarak etkin maddelerin deriye taşınması için, *stratum corneum* bariyerini aşabilmesi ve hedef bölgelere ilaçların ulaştırabilmesinde etkin olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda in vitro deriden penetrasyon çalışması verilerine göre; tazaroten ve takrolimusun deride özellikle derinin hedef bölgesi olan canlı epidermis ve dermiste yüksek oranda lokalizasyonunu sağlayan TZ 4-TW 1 ve TC 4-SK 1 kodlu transetozomların sitotoksik potansiyeli pozitif kontrol olarak sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile karşılaştırmalı olarak (Gürbüz ve ark. 2015; Kahraman ve ark. 2016) değerlendirildi. Bu kapsamda, tazaroten ve takrolimus yüklü transetozomlar, boş

transetozomlar ve SDS'nin sitotoksik etkisi IC_{50} değeri olarak ifade edilmiş ve hesaplanan değerler sırasıyle Tablo 4.66 ve 4-67'de gösterilmiştir.

Boş ve tazaroten yüklü TZ 4-TW 1 kodlu transetozomun IC_{50} değerleri sırayla 5,09 ve 6,96 mg/ml olarak; boş ve takrolimus yüklü TC 4-SK 1 kodlu transetozomun IC_{50} değerleri ise sırayla 3,36 ve 2,8 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu veriler karşılaştırıldığında; boş ve etkin madde yüklü tazaroten için seçilen transetozom formülasyonlarının IC_{50} değerleri, SDS'in IC_{50} değerine göre (0,0476 mg/ml) sırasıyla 146 ve 107 kat yüksek bulunurken, benzer şekilde boş ve takrolimus yüklü transetozomların için sırasıyla 71 ve 59 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır (Şekil 4.67). Seçilen transetozomların bileşenlerinin literatürde güvenli olduğu bildirilmekle birlikte (Arechabala ve ark. 1999; Montanari ve ark. 2007; Dai ve ark. 2013) yapılan bu hücre kültürü çalışmaları verileri ile de optimize edilen taşıyıcı sistemin sitotoksik açıdan güvenli olduğu gösterilmiştir. Bu durum optimum olarak önerilen formülasyonların deri tarafından iyi tolere edilebileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Bu tez çalışması bulguları ile; transetozom ilaç taşıyıcı sistemlerinin tazaroten ve takrolimusun derinin canlı epidermis ve dermis tabakalarına ulaşmasını sağladığı ve derinin hedef tabakalarındaki lokalizasyonunu arttırdığı in vitro koşullarda bantla soyma tekniği ile kantitatif olarak saptanmış ve konfokal mikroskop analizleri ile görüntülenmiştir. Böylece, topikal psoriazis tedavisine yönelik tazaroten ve takrolimusun nano boyutlu transetozom tipi veziküler ilaç taşıyıcı sisteminin konvansiyonel formülasyonlara alternatif teşkil etme potansiyelinin bulunduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak; çalışmamızda optimize edilen transetozom formülasyonları topikal psoriazis tedavisine yönelik tazaroten ve takrolimus için alternatif taşıyıcı sistemler olarak değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR

Abdulbaqi, I.M., Darwis, D., Khan, N.A.K., Abou Assi, R. ve Khan, A.A. (2016). Ethosomal nanocarriers: the impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. *International Journal of Nanomedicine,* **11**, 2279–2304.

Agrawal, U., Gupta, M. ve Vyas. S.P. (2015). Capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the treatment of psoriasis capsaicin delivery into the skin with lipidic nanoparticles for the he treatment of psoriasis. *Artifi cial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, **43**, 33–39.

Ahmed, T. (2015). Preparation of transfersomes encapsulating Sildenafil aimed for transdermal drug delivery: plackett-burman design and characterization. *Journal of liposome research*, **25**, 1–10.

Almog, S., Kushnir, T., Nir, S. ve Lichtenberg, D. (1986). Kinetic and structural aspects of reconstitution of phosphatidylcholine vesicles by dilution of phosphatidylcholine-sodium cholate mixed micelles. *Biochemistry,* **25**(9),2597–2605.

Alper, S., Akyol, M., Atakan, N., Başkan, E.B., Gürer, M.A., Koç, E. ve ark. (2012). Türkiye Psoriasis Tedavi Kılavuzu-2012. Turkish Guideline for the Treatment of Psoriasis-2012. *Türkderm*, **46**, 1-36.

Alvi, I.A. Madan, J., Kaushik, D., Sardana, S., Pandey, R.S. ve Ali, A. (2011). Comparative study of transfersomes, liposomes, and niosomes for topical delivery of 5-fluorouracil to skin cancer cells: Preparation, characterization, in-vitro release, and cytotoxicity analysis. *Anti-cancer drugs,* **22**, 774–82.

Alwan, W. ve Nestle, F.O. (2015). Pathogenesis and treatment of psoriasis : exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. *Clinical and Exp Rheumatology*, **33**(93), S2–6.

Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L.J.M. ve De Roeck-Holtzhauer, Y. (1999). Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the Neutral Red Test, MTT assay and LDH release. *Journal of Applied Toxicology*, **19**(3), 163–65.

Ascenso, N., Raposo, S., Batista, C., Cardoso, P., Mendes, T., Parça, F.G. ve ark. (2015). Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. *International*

Journal of Nanomedicine, **10**, 5837–51.

Ashcroft, D. M., Li Wan Po, A. ve Griffiths, C.E.M. (2000). Therapeutic strategies for psoriasis." *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **25**(1), 1–10.

Ashtikar, M., Nagarsekar, K. ve Fahr, A. (2016). Transdermal delivery from liposomal formulations – Evolution of the technology over the last three decades. *Journal of Controlled Release*, **242**, 126–40.

Badawy, A.M., Abd El-Alim, E.A.B. ve Saad, A.S. (2010). Stability-indicating spectrophotometric methods for determination of tazarotene in the presence of its alkaline degradation product by derivative spectrophotometric techniques. *Drug Testing and Analysis*, **2**(3), 130–36.

Bal, S.M., Hortensius, S., Ding, Z., Jiskoot, W. ve Bouwstra, J.A. (2011). Co-Encapsulation of antigen and Toll-like Receptor ligand in cationic liposomes affects the quality of the immune response in mice after intradermal vaccination. *Vaccine*, **29**(5), 1045–52.

Baliwag, J., Barnes, D.H. ve Johnston, A. (2015). Cytokines in psoriasis. *Cytokine*, **73**, 342–50.

Barry, B.W. (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **14**(2), 101–14.

Basko-plluska, J.L. ve Petronic-rosic, V. (2012). Psoriasis : epidemiology , natural history , and differential diagnosis. *Psoriasis: Targets and Therapy*, **2**, 67–76.

Beck, L.A. (2005). The efficacy and safety of tacrolimus ointment: a clinical review. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **53**(2), S165–70.

Benedetto, A.D., Kubo, A. ve Beck, L.A. (2012). Skin Barrier disruption : a requirement for allergen sensitization ?. *Journal of Investigative Dermatology*, **132**(3), 949–63.

Benson, H.A.E. (2012). Skin Structure, Function, and Preparation. İçinde Benson, H.A.E ve Watkinson, A.C.(Ed.), Transdermal and Topical Drug Delivery: Principles and Practice. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 3-22.

Berth-jones, J. (2013). Psoriasis. *Medicine*, **41**(6), 334–40.

Bhosle, M.J., Kulkarni, A., Steven A., Feldman, R. ve Balkrishnan, R. (2006). Quality of life in patients with psoriasis. *Health and Quality of Life Outcomes*, **4**(35), 1–7.

Bikkad, M.L., Nathani, A.H., Mandlik, S.K., Shrotriya, S.N. ve Ranpise, N.S. (2014). Halobetasol Propionate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for skin targeting by topical delivery. *Journal of liposome research*, **24**(2), 113–23..

Boehncke, W. H., Dressel, D., Zollner, T.M. ve Kaufmann, R. (1996). Pulling the trigger on psoriasis. *Nature*, **379**, 777.

Boehncke, W. ve Schön, M.P (2015). Psoriasis. *Lancet*, **386**, 983–94.

Bragagni, M., Mennini, N., Maestrelli, F., Cirri, M. ve Mura, P. (2012). Comparative study of liposomes, transfersomes and ethosomes as carriers for improving topical delivery of celecoxib ethosomes as carriers for improving topical delivery of Celecoxib. *Drug Delivery*, **19**, 354–61.

Brown, M.B., Martin, G.P., Jones, S. ve Akomeah, F.K. (2006). Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug delivery*, **13**, 175–87.

Cattani, V.B., Fiel, L.A., Jäger, A., Jäger, E., Colomé, L.M., Uchoa, F. ve ark. (2010). Lipid-core nanocapsules restrained the indomethacin ethyl ester hydrolysis in the gastrointestinal lumen and wall acting as mucoadhesive reservoirs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **39**, 116–24.

Celia, C., Cilurzo, F. ve Trapasso, E. (2012). Ethosomes® and Transfersomes® containing linoleic acid : physicochemical and technological features of topical drug delivery carriers for the potential treatment of melasma disorders. *Biomedical Microdevices*, **14**, 119–30.

Cevc, G. (2004). lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**(5), 675–711.

Cevc, G. ve Blume, G. (2001). New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, **1514**(2), 191–205.

Cevc, G., Blume, G. ve Schatzlein, A. (1997). Transfersomes-mediated transepidermal delivery improves the regio- specificity and biological activity of corticosteroids in vivo. *Journal of Controlled Release*, **45**, 211–26.Cevc, G. ve Vierl, U. (2010). Nanotechnology and the transdermal route. a state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release*, **141**(3), 277–99.

Chain, E. ve Kemp, I. (1934). The isoelectric points of lecithin and sphingomyelin. *The Biochemical journal*, **28**(6), 2052–55.

Chandraratna, R.A.S. (1997). Tazarotene: the first receptor-selective topical retinoid for the treatment of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **37**, S12–17.

Chen, M., Zakrewsky, M., Gupta, V., Anselmo, A.C., Slee, D.H., Muraski, J.A. ve ark. (2014). Topical delivery of siRNA into skin using SPACE-Peptide carriers. *Journal of Controlled Release*, **179**, 33–41.

Chen, M., Kumar, S., Anselmo, A.C., Gupta, V., Slee, D.H., Muraski, J.A. ve ark. (2015). Topical delivery of Cyclosporine A into the skin using SPACE-Peptide. *Journal of Controlled Release*, **199**, 190–97.

Chen, Z.X., Li, B., Liu, T., Wang, X., Zhu, Y., Wang, L. ve ark. (2017). Evaluation of paeonol-loaded transethosomes as transdermal delivery carriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99**, 240–45.

Chong, H.T., Kopecki, Z. ve Cowin, A.J. (2013). Lifting the silver flakes : the pathogenesis and management of chronic plaque psoriasis. *BioMed Research International*, **2013**, 1–9.

Cosco, D., Celia, C., Cilurzo, F., Trapasso, E. ve Paolino, D. (2008). Colloidal carriers for the enhanced delivery through the skin. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **5**(7), 737–55.

Dai, Y., Zhou, R., Liu, L., Lu, Y., Qi, j. ve Wu, W. (2013). Liposomes containing bile salts as novel ocular delivery systems for tacrolimus (FK506): in vitro characterization and improved corneal permeation. *International Journal of Nanomedicine*, **8**, 1921–33.

Dando, T.M. ve Wellington, K. (2005). Topical tazarotene a review of its use in the treatment of plaque psoriasis. *American Journal of Clinical Dermatology*, **6**(4), 255–72.

Dayan, N. (2005). Pathways for skin penetration. *Cosmetics & Toiletries® magazine*, **120**(6), 67–76.

Dayan, N. ve Touitou, E. (2000). Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl : ethosomes vs . liposomes. *Biomaterials*, **21**, 1879–85.

Değim, T. (2009). Deriden emilim ve deriye uygulanan yarı katı preparatlar. İçinde F. Acartürk, İ. Ağabeyoğlu, N. Çelebi, T. Değim, Z. Değim, T. Doğanay, S. Takka ve F. Tırnaksız (Ed.), *Modern Farmasötik Teknoloji.* Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını; 337-364.

Dubey, V., Mishra, D. ve Jain, N.K. (2007). Melatonin loaded ethanolic liposomes : physicochemical characterization and enhanced transdermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **67**,398–405.

Duvic, M., Nagpal, S., Asano, A.T. ve Chandraratna, R.A.S. (1997). Molecular mechanisms of tazarotene action in psoriasis. *Journal of the American Academy of*

Dermatology, **37**(2), S18–24.

Dvorakova, V. ve Markham, T. (2013). Psoriasis: current treatment options and recent advances. *Prescriber*, **24**(10), 13–20.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. ve Barry, B.W. (2000). Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *International Journal of Pharmaceutics*, **196**(1), 63–74.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. ve Barry, B.W. (2001). Skin hydration and possible shunt route penetration in controlled estradiol delivery from ultradeformable and standard liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**, 1311–22.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. ve Barry, B.W. (2004). Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes." *International Journal of Pharmaceutics*, **276**, 143–61.

El Maghraby, G.M.M., Williams, A.C. ve Barry, B.W. (2006). Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin?. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, **58**, 415–29.

El Maghraby, G.M., Barry, B.W. ve Williams, A.C. (2008). Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **34**, 203–22.

Elsayed, M.M.A., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F. ve Khalafallah, N.M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, **332**, 1–16.

El Zaafarany, G.M., Awad, G.A.S., Holayel, S.M. ve Mortada, N.D. (2010). Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **397**, 164–72.

Erdal, S., Özhan, G., Mat, M.C., Özsoy, Y., Güngör, S. (2016). Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine: characterization studies and in vitro and in vivo evaluations. *International Journal of Nanomedicine*, **11,** 1027-1037.

Erdal, M.S., Peköz, A.Y., Aksu, B. ve Araman, A. (2014). Impacts of chemical enhancers on skin permeation and deposition of terbinafine. *Pharmaceutical Development and Technology*, **19**(5), 565–70.

Erdogan, M., Wright, J.R. ve McAlister, V.C. (2002). Liposomal tacrolimus lotion as a novel topical agent for treatment of immune-mediated skin disorders: experimental studies in a murine model. *British Journal of Dermatology*, **146**(6), 964–67.

Eroğlu, İ., Azizoğlu, E., Özyazıcı, M., Nenni, M., Gürer Orhan, H., Özbal, S. ve ark. (2016). Effective topical delivery systems for corticosteroids: dermatological and histological evaluations. *Drug Delivery*, **23**(5), 1502–1513.

Escobar-Chávez, J.J., Merino-Sanjuán, V., López-Cervantes, M., Urban-Morlan, Z., Piñón-Segundo, E., Quintanar-Guerrero, D. ve ark . (2008). The tape-stripping technique as a method for drug quantification in skin. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **11**, 104–30.

Fluhr, J.W., Cavallotti, C. ve Berardesca, E. (2008). Emollients , moisturizers , and keratolytic agents in psoriasis. *Clinics in Dermatology*, **26**, 380–86.

Fotakis, G. ve Timbrell, J.A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, **160**(2), 171–77.

Gaffen, S.L., Jain, R., Garg, A.V. ve Cua, D.J. (2015). IL-23-IL-17 Immune Axis: discovery, mechanistic understanding, and clinical testing. *Nature Reviews Immunology*, **14**(9), 585–600.

Garg, V., Singh, H., Singh, B. ve Beg, S. (2017). Systematic development of transethosomal gel system of piroxicam : formulation optimization , in vitro evaluation , and ex vivo assessment. *AAPS PharmSciTech*, **18**, 58–71.

Goebel, A.S.B., Neubert, R.H.H. ve Wohlrab, J. (2011). Dermal targeting of tacrolimus using colloidal carrier systems. *International Journal of Pharmaceutics*, **404**, 159–68.

Gottlieb, A.B. (2005). Therapeutic options in the treatment of psoriasis and atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **53**, 3–16.

Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J. ve ark. (1995). X-Ray Structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-lmmunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, **82**, 507–22.

Grozdev, I., Korman, N. ve Tsankov, N. (2014). Psoriasis as a systemic disease. *Clinics in Dermatology*, **32**, 343–50.

Güngör, S. ve Rezigue, M. (2017). Nanocarriers mediated topical drug delivery for psoriasis treatment. *Current Drug Metabolism*, 18, baskıda.

Gürbüz, A., Özhan, G., Güngör, S., Erdal, M.S. (2015). Colloidal carriers of isotretinoin for topical acne treatment: Skin uptake, ATR-FTIR and in vitro cytotoxicity studies. *Archives of Dermatological Research*, **307**(607-615)

Guo, F., Wang, J., Ma, M., Tan, F. ve Li, N. (2015). Skin targeted lipid vesicles as

novel nano-carrier of ketoconazole: characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine,* **26**(4), 1–13.

Gupta, M., Agrawal, U. ve Vyas, S.P. (2012). Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. *Expert Opinion on Drug Delivery,* **9**(7), 783–804.

Gürer, M.A. ve Adışen, A. (2008). Psoriasis, genel bilgiler , epidemiyoloji. *Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi,* **42**(2), 15–17.

Hadgraft, J. (1999). Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics,* **184**(1), 1–6.

Hadgraft, J., Plessis, J.P. ve Goosen, C. (2000). The selection of non-steroidal anti-inflammatory agents for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics,* **207**, 31–37.

Harrison, J.E., Groundwater, P.W., Brain, K.R. ve Hadgraft, J. (1996). Azone induced fluidty in human stratum corneum. A fourier transform infrared spectroscopy investigation using the perdeuterated analouge. *Journal of Controlled Release*, **41**, 283-290.

Herbig, M.E., Houdek, P., Gorissen, S., Zorn-Kruppa, M., Wladykowski, E., Volksdorf, T. ve ark. (2015). A custom tailored model to investigate skin penetration in porcine skin and its comparison with human skin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **95**, 99–109.

Horn, E.J., Domm, S., Katz, H.I., Lebwohl, M., Mrowietz, U. ve Kragballe, K. (2010). Topical corticosteroids in psoriasis : strategies for improving safety. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **24**, 119–24.

Huang, H., Shen, E., Tang, S., Tan, X., Guo, X., Wang, Q. ve ark. Increased serum resistin levels correlate with psoriasis : a meta-analysis. *Lipids in Health and Disease,* **14**(44), 1–9.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). 2005.

Jadoul, A., Doucet, J., Durand, D. ve Preat, V. (1996). Modifications induced on stratum corneum structure after in vitro iontophoresis: ATR-FTIR and X-ray scattering studies. *Journal of Controlled Release*, **42**, 165-173.

Jain, S., Tiwary, A.K., Sapra, B. ve Jain, N.K. (2007). Formulation and evaluation of ethosomes for transdermal delivery of lamivudine. *World Journal of Pharmaceutical Research,* **8**(4), E1–9.

Jain, S., Jain, P., Umamaheshwari, R.B. ve Jain, N.K. (2003). Transfersomes—A novel vesicular carrier for enhanced transdermal delivery: development, characterization, and performance evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **29**(9), 1013–26.

Jean, J. ve Pouliot, R. (2010). In Vivo and In Vitro Models of Psoriasis. İçinde D. Eberli. (Ed.), Tissu Engineering. Rijeka: InTech.

Jiang, S., Hinchliffe, T.E. ve Wu, T. (2015). Biomarkers of an autoimmune skin disease — Psoriasis." *Genomics Proteomics Bioinformatics*, **13**, 224–33.

Kahraman, E., Özhan, G., Özsoy, Y., Güngör, S. (2016). Polymeric micellar nanocarriers of benzoyl peroxide as potential follicular targeting approach for acne treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **146**, 692-699.

Kalb, R.E., Strober, B., Weinstein, G. ve Lebwohl, M. (2009). Methotrexate and Psoriasis: 2009 National Psoriasis Foundation Consensus Conference. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **60**(5), 824–37.

Kalia, Y.N. ve Guy, R.H. (2001). Modeling transdermal drug release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **48**, 159–72.

Kawashima, M., Nakagawa, H., Ohtsuki, M. ve Tamaki, K. (1996). Tacrolimus concentrations in blood during topical treatment of atopic dermatitis. *The Lancet*, **348**, 1240–41.

Kumar, A., Pathak, K. ve Bali, V. (2012). Ultra-adaptable nanovesicular systems: a carrier for systemic delivery of therapeutic agents. *Drug Discovery Today*, **17**, 1233–41.

Kutlubay, U. ve Karakuş, Ö. (2012). Psoriasis: klinik tiplere göre tedavi yaklaşımı. *Dermatoz*, **3**(1), 33–38.

Lademann, J., Richter, H., Schaefer, U.F., Blume-Peytavi, U., Teichmann, A., Otberg, N. ve ark. (2006). Hair follicles–A long-term reservoir for drug delivery. *Skin Pharmacology and Physiology*, **19**, 232–36.

Lademann, J., Jacobi, U., Surber, C., Weigmann, H. J. ve Fluhr, J. W. (2009). The tape stripping procedure - Evaluation of some critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **72**(2), 317–23.

Lapteva, M., Mondon, K., Moller, M., Gurny, M ve Kalia, Y.N. (2014). Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: A targeted approach for the treatment of psoriasis. *Molecular Pharmaceutics*, **11**(9), 2989−3001.

Lapteva, M., Santer, V., Mondon, K., Patmanidis, I., Chiriano, G., Scapozza, L. ve ark. (2014). Targeted cutaneous delivery of ciclosporin A using micellar nanocarriers and

the possible role of Inter-Cluster regions as molecular transport pathways. *Journal of Controlled Release*, **196**, 9–18.

Lau, W.M., Heard, C.M. ve White, A.W. (2013). Design, synthesis and in vitro degradation of a novel co-drug for the treatment of psoriasis. *Pharmaceutics*, **5**, 232–45.

Lebwohl, M. (2005). A Clinician's paradigm in the treatment of psoriasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **53**, 59–69.

Lei, W., Yu, C., Lin, H. ve Zhou, X. (2013). Development of tacrolimus-loaded transfersomes for deeper skin penetration enhancement and therapeutic effect improvement in vivo. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **8**(6), 336–45.

Li, G., Fan, Y., Fan, C., Li, X., Wang, X., Li, M. ve ark. (2012). Tacrolimus-loaded ethosomes : physicochemical characterization and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **82**, 49–57.

Lin, Y., Huang, Z., Zhuo, R. ve Fang, J. (2010). Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. *International Journal of Nanomedicine*, **5**, 117–28.

Liu, X., Liu, H., Liu, J., He, Z., Ding, C., Huang, G. ve ark. (2011). Preparation of a ligustrazine ethosome patch and its evaluation in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*, **6**, 241–247.

López, O., de la Maza, A., Coderch, L., López-Iglesias, C., Wehrli, E. ve Parra, J.L. (1998). Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100. *FEBS Letters*, **426**, 314–18.

Lowes, M.A., Suárez-Fariñas, M. ve Krueger, J.G. (2014). Immunology of psoriasis. *Annual Review of Immunology*, **32**, 227–55.

Luger, T. ve Paul, C. (2007). Potential new indications of topical calcineurin inhibitors. *Dermatology*, **215**, 45–54.

Ma, M., Wang, J., Guo, F., Lei, M., Tan, F. ve Li, N. (2015). Development of nanovesicular systems for dermal imiquimod delivery: Physicochemical characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **26**(6), 1–11.

Madhu, C., Duff, S., Baumgarten, V., Rix, P., Small, D. ve Tang-Liu, D. (1997). Metabolic deesterification of tazarotene in human blood and rat and human liver microsomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **86**(8), 972–74.

Mahmood, S., Taher, M. ve Mandal, U.K.U. (2014). Experimental design and

optimization of raloxifene hydrochloride loaded nanotransfersomes for transdermal application. *International Journal of Nanomedicine*, **9**, 4331–46.

Mahor, S., Rawat, A., Dubey, P.K., Gupta, P.N., Khatri, K., Goyal, A.K. ve ark. (2007). Cationic transfersomes based topical genetic vaccine against hepatitis B. *International Journal of Pharmaceutics*, **340**, 13–19.

Maibach, M. J. Choi H. I. (2005). Liposomes and niosomes as topical drug delivery sistems. *Skin Pharmacology and Physiology*,**18**, 209–19.

Marianecci, C., Di Marzio, L., Rinaldi, F., Celia, C., Paolino, D., Alhaique, F. ve ark. (2014). Niosomes from 80s to present: The state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science*, **205**, 187–206.

Martindale. The Complete Drug Delivery (2005). (34th ed.), Londra, pp 1060.

Mason, A., Mason, J., Cork, M., Hancock, H. ve Dooley, G. (2013). Topical treatments for chronic plaque psoriasis: An abridged cochrane systematic review. *Journal of American Academy of Dermatology*, **69**(5), 799–807.

McKenna, S.P., Cook, S.A., Whalley, D., Doward, L.C., Richards, H.L., Griffiths, C.E. ve ark. (2003). Development of the PSORIQoL , A psoriasis-specific measure of quality of life designed for use in clinical practice and trials. *British Journal of Dermatology*, **149**, 323–31.

Mendelsohn, R., Flach, C.R. ve Moore, D.J. (2006). Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1758**, 923–33.

Mendonça, C.O. ve Burden, A.D. (2003). Current concepts in psoriasis and its treatment. *Pharmacology and Therapeutics*, **99**(2), 133–47.

Menezes, A.C., Campos, P.M., Euletério, C., Simões, S., Praça, F.S., Bentley, M.V. ve ark (2016). Development and characterization of novel 1- (1-Naphthyl) Piperazine-loaded lipid vesicles for prevention of UV-induced Skin Inflammation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **104**, 101–9.

Meng, S., Chen, Z., Yang, L., Zhang, W., Liu, D., Guo, J. ve ark. (2013). Enhanced transdermal bioavailability of testosterone propionate via surfactant-modified ethosomes. *International Journal of Nanomedicine*, **8**, 3051–60.

Mérian, J., Gravier, J., Navarro, F. ve Texier, I. (2012). Fluorescent nanoprobes dedicated to in vivo imaging: From preclinical validations to clinical translation. *Molecules*, **17**(5), 5564–91.

Mitra, A. ve Wu, Y. (2010). Topical delivery for the treatment of psoriasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **7**(8), 977–92.

Moghassemi, S. ve Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *Journal of Controlled Release,* **185**(1), 22–36.

Montanari, J., Perez, A.P., Di Salvo, F., Diz, V., Barnadas, R., Dicelio, L. ve ark. (2007). Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization. *International Journal of Pharmaceutics,* **330**, 183–94.

Monteleone, G., Pallone, F., Mac Donald, Chimenti, T.T.S. ve Costanzo, A. (2011). Psoriasis : from pathogenesis to novel therapeutic approaches. *Clinical Science,* **120**, 1–11.

Morilla, M.J. ve Romero, E.L. (2015). Ultradeformable phospholipid vesicles as a drug delivery system: a review. *Research and Reports in Transdermal Drug Delivery*, **4**, 55–69.

Naik, A., Kalia, Y.N. ve Guy, R.H. (2000). Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, **3**(9), 318–26.

Nasr, M. ve Abdel-hamid, S. (2016). Optimizing the dermal accumulation of a tazarotene microemulsion using skin deposition modeling. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **42**(4), 636–43.

Nidhi, K., Indrajeet, S., Khushboo, M., Gauri, K. ve Sen, D.J. (2011). Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review. *International Journal of Drug Development and Research*, **3**(2), 26–33.

Okyar, A., Özsoy, Y. ve Güngör, S. (2012). Novel formulation aproaches for dermal and transdermal delivery of non-steroidal anti-inflammatory drugs. İçinde A.B. Lemmey (Ed.) Rheumatoit Artritis –Treatment. Rijeka, Hırvatistan: InTech, 1-25.

Onsun, N. (2008). Psoriasis tedavi yöntemleri ve algortitmik yaklaşım. *Turkderm,* **42**(2), 31–41.

Ortiz, N.E.G., Nijhawan, R.I. ve Weinberg, J.M. (2013). Acitretin. *Dermatologic Therapy*, **26**, 390–99.

Otberg, N., Patzelt, A., Rasulev, U., Hagemeister, T., Linscheid, M., Sinkgraven, R. ve ark. (2008). The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, **65**(4), 488–92.

Partearroyo, M.A., Alonso, A., Goni, F.M, Tribout, M. ve Paredes, S. (1996). Solubilization of phospholipid bilayers by surfactants belonging to the Triton x series :

effect of polar group size. *Journal of Colloid and Interface Science*, **178**, 156–59.

Patel, M.R., Patel, R.B., Parikh, R. ve Patel, B.G. (2010). HPTLC method for estimation of tazarotene in topical gel formulations and in vitro study, *Analitical Methods*, **2**, 275–81.

Patel, P., Patel, H., Mehta, T. ve Panchal, S. (2012). Formulation strategies for drug delivery of tacrolimus: An overview. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, **2**(4), 169–75.

Patel, P., Panchal, S.S. ve Mehta, T.A. (2013). Improvement of dissolution rate of tacrolimus by solid dispersion technique. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, **43**, 45–53.

Patel, P., Patel, H.K., Panchal, S.S ve Mehta, T.A. (2013). Self micro-emulsifying drug delivery system of tacrolimus : Formulation , in vitro evaluation and stability studies. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, **3**(2), 95–104.

Patel, R., Bharatbhai, P.R., Parikh, J.R. ve Patel, B.G. (2016). Novel microemulsion-based gel formulation of tazarotene for therapy of acne. *Pharmaceutical Development and Technology*, **21**(8), 921–32.

Pathak Y., Thassu, D. (2009). Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization. London: Informa Healthcare.

Patzelt, A., Antoniou, C., Sterry, W. ve Lademann, J. (2008). Skin penetration from the inside to the outside: A review. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, **5**(2), 229–35.

Paulis, De Amato., Stellalo, C., Cirillo, R., Ciccarelli, A., Oriente, A. ve Marone, G. (1992). Anti-inflammatory effects of FK506 on human skin mast cells. *Journal of Investigative Dermatology*, **99**, 723–28.

Perera, G.K., Di Meglio, P. ve Nestle, F.O. (2012). Psoriasis. *Annual Reviews of Pathology: Mechanisms of Disease*, **7**, 385–422.

Polozova, A.I., Dubachev, G.E., Simonova, T.N. ve Barsukov, L.I. (1995). Temperature-induced micellar-lamellar transformation in binary mixtures of saturated phosphatidylcholines with sodium cholate. *FEBS Letters*, **358**(1), 17–22.

Pople, P.V. ve Singh, K.K. (2011). Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier : application to topical delivery of tacrolimus. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **79**(1), 82–94.

Pradhan, M., Singh, D. ve Singh, M.R. (2013). Novel colloidal carriers for psoriasis:

current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. *Journal of Controlled Release*, **170**(3), 380–95.

Puglia, C. ve Bonina, F. (2012). Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **9**(4), 429–41.

Radomska-Soukharev, A. (2007). Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **59**(6),411–18.

Rahman, M., Akhter, S., Ahmad, J., Ahmad, M.Z., Beg, S. ve Ahmad, F.J. (2015). Nanomedicine-based drug targeting for psoriasis : potentials and emerging trends in nanoscale pharmacotherapy nanoscale pharmacotherapy. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **12**(4), 635–52.

Rao, Y., Zheng, F., Zhang, X., Gao, J. ve Liang, W. (2008). In Vitro percutaneous permeation and skin accumulation of finasteride using vesicular ethosomal carriers. *AAPS PharmSciTech*, **9**(3), 860–65.

Rapp, S.R., Feldman, S.R., Exum, M.L., Fleischer, A.B. ve Reboussin, D.M. (1999). Psoriasis causes as much disability as other major medical diseases. *Journal of American Academy of Dermatology*, **41**, 401–7.

Raza, K., Singh, B., Mahajan, A., Negi, P., Bhatia, A. ve Katare, O.P. (2011). Design and evaluation of flexible membrane vesicles (FMVs) for enhanced topical delivery of capsaicin. *Journal of Drug Targeting*, **19**(4), 293-302.

Roberts, M.S., Mohammed, Y., Pastore, M.N., Namjoshi, S., Yousef, S., Alinaghi, A. ve ark. (2017). Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release*, **247**, 86–105.

Rosmarin, D.M., Lebwohl, M., Elewski, B.E. ve Gottlieb, A.B. (2010). Cyclosporine and psoriasis: 2008 national psoriasis foundation consensus conference. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **62**(5), 838–53.

Rougier, A., Lott, C., Corcuff, P. ve Maibach, H.I. (1988). Relationship between skin permeability and corneocyte size according to anatomic site, age, and sex in man. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, **39**, 15–26.

Ruzicka, T., Assmann, T. ve Homey, B. (1999). The drug for the turn of the millennium? *Archives of dermatology*, **135**, 574–80.

Ruzicka, T., Bieber. T., Schöpf. E., Rubins, A., Dobozy, A., Bos, J.D. ve ark. (1997). A short-term trial of tacrolimus ointment for atopic dermatitis. *The New England Journal of Medicine*, **337**, 816–21.

Sabeti, B., Noordine, M.I.B, Javar, H.A., Davoudi, E.T. ve Kadivar, A. (2014). Characterization of diclofenac liposomes formulated with palm oil fractions. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research,* **13**(2), 185–90.

Samarasekera, E., Sawyer, L., Parnham, J. ve Smith, C.H. (2012). Assessment and management of psoriasis: Summary of NICE Guidance. *British Medical Journal,* **345**, 1–6.

Saurat, J. H., Stingl, G., Dubertret, L., Papp, K., Langley, R.G., Ortonne, J.P. ve ark. (2008). Efficacy and safety results from the randomized controlled comparative study of adalimumab vs. methotrexate vs. placebo in patients with psoriasis (Champion). *British Journal of Dermatology,* **158**, 558–66.

Savian, A.L., Rodrigues, D., Weber, J., Ribeiro, R.F., Motta, M.H., Schaffazick, S.R. ve ark. (2015). Dithranol-loaded lipid-core nanocapsules improve the photostability and reduce the in vitro irritation potential of this drug. *Materials Science & Engineering C,* **46**, 69–76.

Schoellhammer, C.M., Blankschtein, D. ve Langer, R. (2014). Skin permeabilization for transdermal drug delivery: Recent advances and future prospects. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **11**(3), 393–407.

Schön, M.P. ve Boehncke, E.H. (2005). Psoriasis. *The New England Journal of Medicine,* **352**(18), 1899–1912.

Sehgal, V.N., Srivastava, G. ve Dogra. S. (2008). Tacrolimus in Dermatology—pharmacokinetics, mechanism of action, drug interactions, dosages, and side effects: Part I. *LE JACQ*, **7**, 27–30.

Seo, Y.G., Kim, D.W., Cho, K.H., Yousaf, A.M., Kim, D.S., Kim, J.H. ve ark. (2015). Preparation and pharmaceutical evaluation of new tacrolimus-loaded solid self-emulsifying drug delivery system. *Archives of Pharmacal Research*, **38**(2), 223–28.

Shabir, G.A. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A,* **987**, 57–66.

Shi, Q., Li, J. ve Ding, F. (2012). Development and validation of method for the determination of related substances of tacrolimus in tacrolimus capsules and degradation studies. *International Journal of ChemTech Research,* **4**(4), 1543–52.

Silvander, M., Karlsson, G. ve Edwards, K. (1996). Vesicle solubilization by alkyl sulfate surfactants: A Cryo-TEM study of the vesicle to micelle transition. *Journal of Colloid and Interface Science*, **179**(1), 104–13.

Song, C. K., Balakrishnan, P., Shim, C.K., Chung, S.J., Chong, S. ve Kim, D.D. (2012). A novel vesicular carrier, transethosome, for enhanced skin delivery of voriconazole: characterization and in vitro/in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **92**, 299–304.

Stern, R.S. (2012). The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: A 30-year prospective study. *Journal of American Academy of Dermatology*, **66**(4), 553–62.

Stuart B.H. (2004). Biological Applications. İçinde B. Stuart (Ed.), Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, England: John Wiley&Sons; 138-140.

Subuddhi, U. ve Mishra, A.K. (2007). Micellization of bile salts in aqueous medium: a fluorescence study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **57**(1), 102–7.

Sullivan, T. P., Eaglstein, W.H., Davis, S.C. ve Mertz, P. (2001). The pig as a model for human wound healing. *Wound repair and regeneration*, **9**(2), 66–76.

Tang-Liu, D.D.S., Matsumoto, R.M. ve Usansky, J.I. (1999). Clinical pharmacokinetics and drug metabolism of tazarotene: a novel topical treatment for acne and psoriasis. *Clinical pharmacokinetics*, **37**(4), 273–87.

Tanojo, H., Junginger, H.E. ve Boddé, H.E. (1997). In vivo human skin permeability enhancement by oleic acid: transepidermal water loss and fourier-transform infrared spectroscopy studies. *Journal of controlled release*, **47**, 31–39.

Tanrıverdi, S.T., Özer, Ö. (2013). Novel Topical Formülations of Terbinafine-HCl for treatment of onychomycosis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **48** 628–636

The United States Parmacopeial Convention (2013, Nisan). *Tacrolimus Revision Bulettin Official April 1 2013.* Erişim 12.02.2017, http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/revisions/tacrolimus-m80280-sm1.pdf

Thomson, A.W., Bonham, C.A. ve Zeevi, A. (1995). Mode of action of tacrolimus (FK506): Molecular and cellular mechanisms. *Therapeutic drug monitoring*, **17**(6), 584–91.

Touitou, E., Dayan, L., Bergelson, B. Godin, B. ve Eliaz, M. (2000). Ethosomes -

Novel vesicular carriers for enhanced delivery: Characterization and skin penetration properties. *Journal of Controlled Release*, **65**(3), 403–18.

Touitou E., Godin, B. ve Weiss, C. (2000). Enhanced delivery of drugs into and across the skin by ethosomal carriers. *Drug Development Research,* **50**, 406–15.

Touitou E., Godin, B., Dayan, L., Weiss, C., Piliponsky, A. ve Levi-Schaffer, F. (2001). Intracellular delivery mediated by an ethosomal carrier. *Biomaterials,* **22**(22), 3053–59.

Undre, N. A., Moloney, F.J., Ahmadi, S., Stevenson, P. ve Murphy, G.M. (2009). Skin and systemic pharmacokinetics of tacrolimus following topical application of tacrolimus ointment in adults with moderate to severe atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology,* **160**, 665–69.

Van de Kerkhof, P.C. (2006). Update on retinoid therapy of psoriasis in: an update on the use of retinoids in dermatology. *Dermatologic Therapy,* **19**, 252–63.

Van Meerloo, J., Kaspers, G.J.L. ve Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. *Methods in Molecular Biology,* **731**, 337–45.

Varma, N.S.k., Maheshwari, P.V., Navya, M., Reddy, S.C., Shivakumar, H.G. ve Gowda, D.V. (2014). Calcipotriol delivery into the skin as emulgel for effective permeation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **22**(6), 591–99.

Vemulapalli, V., Banga, A.K. ve Friden, P.M. (2008). Optimization of iontophoretic parameters for the transdermal delivery of methotrexate. *Drug Delivery,* **15**, 437–42.

Venkataramanan, R., Swaminathan, A., Prasad, T., Jain, A., Zuckerman, S., Warty, V. ve ark. (1995). Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clinical pharmacokinetics,* **29**(6), 404–30.

Verma, D.D., Verma, S., Blume, G. ve Fahr, A. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics,* **258**, 141–51.

Verma, P. ve Pathak, K. (2010). Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research,* **1**(3), 274-282.

Verma, P. ve Pathak, K. (2012). Nanosized ethanolic vesicles loaded with econazole nitrate for the treatment of deep fungal infections through topical gel formulation *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine,* **8**(4), 489–96.

Vincent, N., Devi, R. ve Hari, V. (2014). Progress in psoriasis therapy via novel drug delivery systems. *Dermatology Reports,* **6**, 14–18.

Walters, K.A. ve Roberts, M.S. (2002). The structure and function of Skin. İçinde K.A. Walters (Ed.), Dermatological and Transdermal Formulations. New York: Marcel Dekker.

Wiedersberg , S. ve Nicoli, S. (2012). Skin Permeation Assessment: Tape Stripping. İçinde H.A.E. Benson ve A.C. Watkinson (Ed.), Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice. New Jersey: John Wiley & Sons; 109-130.

Williams, A.C. (2003). Chemical Modulation of Topical and Transdermal Permeation. İçinde A.C. Williams (Ed.), Transdermal and Topical Drug Delivery: From theory to clinical practice. London: Pharmaceutical Press; 83-122.

White, B., Banerjee, S., Brien, S.O., Turro, N.J. ve Herman, I.P. (2007). Zeta-potential measurements of surfactant-wrapped individual single-walled carbon nanotubes. *Journal of Physical Chemistry C*, **2**(1), 13684–13690.

Wu, X. ve Guy, R.H. (2009). Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **19**(6), 371–84.

Yosipovich, G. ve Maibach, H. (1996). Skin surface pH A protective acid mantle. *Cosmetics & Toiletries® magazine*, **111**(12), 101.

Yu, B., Ma, P., Yuan, L., Chen, D. ve Yang, J. (2015). Evaluation of change in the skin concentration of tazarotene and betamethasone dipropionate based on drug – drug interaction for transdermal drug delivery in miniature pig. *Xenobiotica*, **45**(5), 380–84.

Zhang, H., Zhu, X., Shen, J., Xu, H., Ma, M., Gu, W. ve ark. (2016). Characterization of a liposome-based artificial skin membrane for *in vitro* permeation studies using franz diffusion cell device. *Journal of Liposome Research*, **28**, 1–10.

Zhang, J., Wei, y., Zhou, Y., Li, Y. ve Wu, X. (2012). Ethosomes, binary ethosomes and transfersomes of terbinafine hydrochloride: A comparative study. *Arch Pharm Res*, **35**(1), 109–17.

Zhang, Z., Tsai, P., Ramezanli, T. ve Michniak-Kohn, B.B. (2013). Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **5**, 205–18.

Zhaowu, Z., Xiaoli, W., Yangde, Z. ve Nianfeng, L. (2009). Preparation of matrine ethosome, its percutaneous permeation in vitro and anti-inflammatory activity in vivo in rats. *Journal of liposome research*, **19**(2), 155–62.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

TELİF HAKKI İZNİ