SİNEM GÜNGÖRDÜK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2017

← Adınızı soyadınızı giriniz

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

↓

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

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ATOPİK DERMATİT TEDAVİSİNE YÖNELİK TOPİKAL NANO İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN OPTİMİZASYONU IN VİTRO/IN VİVO DEĞERLENDİRİLMESİ

SİNEM GÜNGÖRDÜK

DANIŞMAN
PROF. DR. SEVGİ GÜNGÖR

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Farmasötik Teknoloji Programında Doktora öğrencisi Sinem Güngördük tarafından Prof. Dr. Sevgi Güngör'ün danışmanlığında hazırlanan "Atopik Dermatit Tedavisine Yönelik Topikal Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Optimizasyonu, *In vitro/In vivo* Değerlendirilmesi" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 17/03/2017 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 Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Jüri
Prof. Dr. Özgen ÖZER
Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

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

Jüri
Yrd. Doç. Dr. M. Sedef ERDAL
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Teknoloji 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.

Sinem Güngördük

(İmza)



İTHAF

Anneme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca tez ve proje çalışmalarımın yönetilmesi ve yönlendirilmesinde gösterdiği yakın ilgi ve desteklerinden dolayı bilimsel bakış açısıyla vizyonumu genişleten ve manevi desteğini her zaman hissettiğim danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Sevgi Güngör**'e;

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

Doktora öğrenimim boyunca gösterdiği destekleri ile San-Tez projesi'nde yer almamdaki referansı için Sayın **Prof. Dr. Yıldız Özsoy-Erginer**'e

Tez çalışmam boyunca gösterdiği yakınlık ve San-Tez projesindeki katkıları için Sayın **Yrd. Doç. Dr. Sedef Erdal**'a;

Doktora öğrenimim sırasındaki destekleri için Sayın **Prof. Dr. Erdal Cevher'e**, Sayın **Yrd. Doç. Dr. Ayca Yıldız Peköz'**e ve **Uzm. Ecz. Burcu Mesut** başta olmak üzere Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma;

Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı San-Tez Programı projesinde proje ortağı firma olarak **Bilim İlaç**'a;

Doktora eğitimimde beni cesaretlendirilen, maddi ve manevi destek sağlayan dayım **Av. A. Murat Akın**'a ve ağabeyim **Doç. Dr. Kemal Güngördük**'e;

Akademik hayatım boyunca her an yanımda olan, bana her konuda destek olan, sabrını, sevgisini ve dualarını esirgemeyen değerli annem **Behiye Güngördük**'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimimde 2211- Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında beni destekleyen **Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu**'na (**TÜBİTAK**) teşekkür ederim.

Bu çalışma, **Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı San-Tez Programı** kapsamında desteklenmiştir. Proje Kod No: 01532.STZ.2012-2. Tez projesi, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından da desteklenmiştir. Proje No: 21220.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ XV
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... XXİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XXVİİ
ÖZET ..... XXİX
ABSTRACT XXX
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. Deri Hakkında Genel Bilgiler 5
2.1.1. Derinin Yapısı ve Genel Özellikleri 5
2.1.1.1. Hipodermis (Deri Altı Yağ Tabakası) 5
2.1.1.2. Dermis (*Corium*) 6
2.1.1.3. Epidermis 6
2.1.1. Deriden Geçiş Yolları 8
2.2. Atopik Dermatit Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler 12
2.2.1. AD Patogenezi 13
2.2.2. Atopik Dermatit Hastalığında Derinin Durumu 14
2.3. Atopik Dermatit Hastalığının Tedavisi Hakkında Genel Bilgiler 17
2.3.1. Topikal Tedavi 17
2.3.1.1. Derinin Nemlendirilmesi 18
2.3.1.2. Topikal Kortikosteroitler 18
2.3.1.3. Topikal Kalsinörin İnhibitörleri 18
2.3.1.4. Antibakteriyel ve Antimikotik Tedavisi 19
2.3.2. Fototerapi 20
2.3.3. Sistemik Tedavi 20
2.4. Takrolimus Hakkında Genel Bilgiler 20
2.4.1. Takrolimusun Yapısı ve Özellikleri 21

2.4.2. Takrolimus İçeren Müstahzarlar 22
2.4.3. Takrolimus İçeren Yenilikçi İlaç Taşıyıcı Sistemler 22
2.5. Fusidik Asit Hakkında Genel Bilgiler.....25
2.5.1. Fusidik Asit'in Yapısı ve Özellikleri 25
2.5.2. Fusidik Asit İçeren Müstahzarlar.....26
2.6. Merhemler Hakkında Genel Bilgiler 28
2.7. Mikroemülsiyonlar Hakkında Genel Bilgiler 30
2.7.1. Tanımı 30
2.7.2. Mikroemülsiyonların Yapısal Özellikleri 31
2.7.3. Mikroemülsiyonların Bileşenleri 32
2.7.3.1. Yağ Fazı 33
2.7.3.2. Sürfaktanlar.....34
2.7.3.3. Kosürfaktanlar.....35
2.7.3.4. Su fazı.....35
2.7.3.5. Etkin madde 36
2.7.4. Mikroemülsiyon Hazırlanması ve Üçgen Faz Diyagramlarının Oluşturulması36
2.7.5. Mikroemülsiyonların Oluşum Teorileri 38
2.7.6. Mikroemülsiyonların Fizikokimyasal Özellikleri.....39
2.7.7. Mikroemülsiyonların Avantaj ve Dezavantajları 41
2.7.8. Mikroemülsiyonların Topikal/Transdermal İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Uygulanması 42
2.8. Topikal Formülasyonların *In Vitro* Salım ve Penetrasyon Çalışmaları 44
2.8.1. *In vitro* Salım Çalışmaları 45
2.8.2. *In vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmaları 45
2.8.2.1. Bant ile Soyma Yöntemi (Tape stripping) Hakkında Genel Bilgiler.....45
2.8.2.2. Bant ile Soyma Yönteminin Uygulanışı 47
2.9. Laser Taramalı Konfokal Mikroskop ile Görüntüleme Tekniği 48
2.10. *In Vivo* Çalışmalar.....49
2.11. *In Vitro ve In Vivo* Koşullarda ATR-FTIR (Hafifletilmiş Toplam Yansımalı Kızılötesi Spektroskopisi/ Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy) Spektroskopisi Analizleri 50
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....52
3.1. Gereçler.....52

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 52
3.1.2. Kullanılan Cihazlar 53
3.1.3. Kullanılan Malzemeler.....54
3.1.4. Kullanılan Bilgisayar Programları 55
3.2. Yöntemler 55
3.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları 55
3.2.1.1. Etkin Maddelerin İnfrared (IR) Spektrumu.....55
3.2.1.2. Etkin Maddelerin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizleri.....55
3.2.1.3. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenlerindeki Çözünürlük Çalışmaları 56
3.2.1.4. Etkin Maddelerin Çözünme Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmaları.....56
3.2.1.5. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenleri ile Safsızlık Çalışmaları 57
3.2.2. Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmaları 57
3.2.2.1. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesi.....60
3.2.2.2. Mikroemülsiyonların Seçilmesi 61
3.2.3. Etkin Madde Yüklenmemiş Merhem Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmaları 61
3.2.4. Etkin Maddelerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi Çalışmaları.....62
3.2.4.1. Analiz Çalışma Koşulları 63
3.2.4.2. Hareketli Fazın Hazırlanması.....63
3.2.5. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Çalışmaları.....63
3.2.5.1. Standart Örneklerin Hazırlanması.....64
3.2.5.2. Doğrusallık.....64
3.2.5.3. Kesinlik 64
3.2.5.4. Doğruluk 65
3.2.5.5. Seçicilik.....65
3.2.5.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL).....66
3.2.5.7. Stabilite 66
3.2.6. Fusidik Asitin HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Çalışmaları.....66
3.2.6.1. Standart Örneklerin Hazırlanması.....66

3.2.6.2. Doğrusallık 67
3.2.6.3. Kesinlik 67
3.2.6.4. Deriden ve Banttan Fusidik asidin Geri Kazanımı (Doğruluk) 67
3.2.6.5. Seçicilik 68
3.2.6.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 68
3.2.6.7. Stabilite 68
3.2.7. Fusidik Asitin *In Vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Çalışmaları 68
3.2.7.1. Standart Örneklerin Hazırlanması 68
3.2.7.2. Doğrusallık 69
3.2.7.3. Kesinlik 69
3.2.7.4. Doğruluk 69
3.2.7.5. Seçicilik 70
3.2.7.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 70
3.2.7.7. Stabilite 70
3.2.8. Takrolimusun Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi 70
3.2.8.1. Analiz Çalışma Koşulları 71
3.2.8.2. Hareketli Fazın Hazırlanması 71
3.2.9. Takrolimusun *In vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 71
3.2.9.1. Standart Örneklerin Hazırlanması 71
3.2.9.2. Doğrusallık 72
3.2.9.3. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 72
3.2.10. Takrolimusun *In vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu 72
3.2.10.1. Standart Örneklerin Hazırlanması 72
3.2.10.2. Doğrusallık 73
3.2.10.3. Kesinlik 73
3.2.10.4. Deriden ve Banttan Takrolimusun Geri Kazanımı (Doğruluk) 73
3.2.10.5. Seçicilik 74
3.2.10.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 74

3.2.11. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyon Çalışmaları 74
3.2.12. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyon Çalışmaları 76
3.2.13. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Merhemlerin Optimizasyon Çalışmaları .76
3.2.14. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Karakterizasyon Çalışmaları 77
3.2.14.1. Fiziksel Görünüş 78
3.2.14.2. Refraktif İndeks.....78
3.2.14.3. pH.....78
3.2.14.4. İletkenlik 78
3.2.14.5. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi 79
3.2.14.6. Zeta Potansiyeli.....79
3.2.14.7. Viskozite 79
3.2.14.8. Fiziksel Stabilite.....79
3.2.14.9. Polarize Işık Mikroskobu 79
3.2.14.10. Hacim Fraksiyonunun Belirlenmesi.....80
3.2.15. Mikroemülsiyonlardan Etkin Maddelerin *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmaları 80
3.2.16. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların ATR-FTIR (Azaltılmış Toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmaları 81
3.2.17. Nil Kırmızı Yüklü Mikroemülsiyonların Derinin Tabakalarındaki Penetrasyonun Konfokal Mikroskop Görüntüleme Tekniği (CLSM) ile İncelenmesi Çalışmaları 82
3.2.18. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Stabilite Çalışmaları 82
3.2.18.1. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyonunun Stabilitesinin Değerlendirilmesi.....83
3.2.18.2. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesinin Değerlendirilmesi.....86
3.2.19. *In vivo* Koşullarda Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Deri Üzerindeki Etkilerinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesi 86
3.2.20. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Fiziksel Kontrolleri.....87
3.2.20.1. Görünüş 87
3.2.20.2. pH.....87

3.2.20.3. Viskozite 87
3.2.21. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Stabilite Çalışmaları 87
3.2.22. Merhem Formülasyonundan Etkin Maddelerin Sentetik Membrandan *In Vitro* Salım Çalışmaları 89
3.2.23. Merhem Formülasyonundan Etkin Maddelerin Domuz Derisinden *In Vitro* Penetrasyon Çalışmaları 90
3.2.24. Etkin Madde Yüklü Merhem Formülasyonunun ATR-FTIR (Azaltılmış Toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmaları 90
3.2.25. İstatiksel Analiz.....90
4. BULGULAR.....92
4.1. Ön Formülasyon Çalışma Bulguları 92
4.1.1. Etkin maddelerin İnfrared (IR) Spektrumu Bulguları.....92
4.1.2. Etkin maddelerin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizlerine Ait Bulgular.....92
4.1.3. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenlerindeki Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulguları 93
4.1.4. Etkin Maddelerin Çözünme Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulguları.....96
4.1.5. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenleri ile Safsızlık Çalışmalarına Ait Bulgular 96
4.2. Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 98
4.2.1. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesine Ait Bulgular.....100
4.2.2. Mikroemülsiyonların Seçilmesine Ait Bulgular 108
4.3. Etkin Madde Yüklenmemiş Merhem Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 108
4.4. Etkin Maddelerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular.....110
4.5. Takrolimusun HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları 110
4.5.1. Standart Örneklerin Hazırlanması.....110
4.5.2. Doğrusallık.....110
4.5.3. Kesinlik 111
4.5.4. Doğruluk 112

4.5.5. Seçicilik....112
4.5.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 112
4.5.7. Stabilite 112
4.6. Fusidik Asitin HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları....113
4.6.1. Standart Örneklerin Hazırlanması....113
4.6.2. Doğrusallık....113
4.6.3. Kesinlik 114
4.6.4. Deriden ve Banttan Fusidik asidin Geri Kazanımı (Doğruluk) 114
4.6.5. Seçicilik....115
4.6.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 115
4.6.7. Stabilite 115
4.7. Fusidik Asitin *In Vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları 116
4.7.1. Standart Örneklerin Hazırlanması....116
4.7.2. Doğrusallık....116
4.7.3. Kesinlik 117
4.7.4. Doğruluk 118
4.7.5. Seçicilik....118
4.7.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 118
4.7.7. Stabilite 118
4.8. Takrolimusun Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular....119
4.9. Takrolimusun *In Vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yöntemin Validasyon Bulguları 119
4.9.1. Standart Örneklerin Hazırlanması....119
4.9.2. Doğrusallık....119
4.9.3. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 120
4.10. Takrolimusun *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları....120
4.10.1. Standart Örneklerin Hazırlanması....120
4.10.2. Doğrusallık....120
4.10.3. Kesinlik 122
4.10.4. Derideki ve Banttaki Takrolimusun Geri Kazanımı (Doğruluk) 122

4.10.5. Seçicilik.....123
4.10.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL) 124
4.11. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular 124
4.12. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular.....127
4.13. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Merhemlerin Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....127
4.14. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....130
4.14.1. Fiziksel Görünüş 130
4.14.2. Refraktif İndeks (RI).....131
4.14.3. pH.....131
4.14.4. İletkenlik 132
4.14.5. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi 140
4.14.6. Zeta Potansiyeli.....140
4.14.7. Viskozite 141
4.14.8. Fiziksel stabilite 141
4.14.9. Polarize Işık Mikroskobu 142
4.14.10. Hacim Fraksiyonunun Felirlenmesi 142
4.15. Mikroemülsiyonlardan Etkin Maddelerin *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarına Çalışmalarına Ait Bulgular 142
4.16. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların ATR-FTIR (Azaltılmış Toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmalarına Ait Bulgular 146
4.17. Nil Kırmızı Yüklü Mikroemülsiyonların Derinin Tabakalarındaki Penetrasyonun Konfokal Mikroskop Görüntüleme Tekniği (CLSM) ile İncelenmesi Çalışmalarına Ait Bulgular.....146
4.18. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 149
4.18.1. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikromeülsiyon Formülasyonunun Stabilitesinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular.....149
4.18.2. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular.....154

4.19. *In vivo* Koşullarda Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyonun Deri Üzerindeki Etkilerinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesine Ait Bulgular 157
4.20. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Fiziksel Kontrollerine Ait Bulguları 161
4.20.1. Görünüş 161
4.20.2. pH 161
4.20.3. Viskozite 161
4.21. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular 162
4.22. Merhem Formülasyonundan Etkin Maddelerin Sentetik Membrandan *In Vitro* Salım Çalışmaları Bulguları 166
4.23. Merhem Formülasyondan Etkin Maddelerin Domuz Derisinden *In Vitro* Penetrasyon Çalışmaları Bulguları 169
4.24. Etkin Madde Yüklü Merhem Formülasyonunun ATR-FTIR (Azaltılmış toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmalarına Ait Bulgular 171
5. TARTIŞMA 172
KAYNAKLAR 206
HAM VERİLER 232
FORMLAR 233
ETİK KURUL KARARI 234
PATENT HAKKI İZNİ 237
TELİF HAKKI İZNİ 267
ÖZGEÇMİŞ 268

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Deriden geçişi etkileyen faktörler 10
Tablo 2-2: Deriden geçişin artırılmasında kullanılan yöntemler 11
Tablo 2-3: Türkiye pazarında bulunan takrolimus içeren müstahzarlar 22
Tablo 2-4: Takrolimus ile hazırlanan topikal/transdermal uygulamaya yönelik nanotaşıyıcı sistemler 24
Tablo 2-5: Türkiye pazarında bulunan fusidik asit (*sodyum fusidat) içeren topikal müstahzarlar 26
Tablo 2-6: Türkiye pazarında bulunan fusidik asit ve steroit içeren topikal müstahzarlar 27
Tablo 2-7: Mikroemülsiyonlar ve klasik emülsiyonlar arasındaki farklılıklar 31
Tablo 3-1: Etkin maddelerin mikroemülsiyon ve merhem formülasyonları bileşenlerindeki çözünürlük çalışmalarında kullanılan yardımcı maddeler 56
Tablo 3-2: Etkin maddelerin mikroemülsiyon ve merhem formülasyonları bileşenleri ile safsızlık çalışmalarında kullanılan yardımcı maddeler 57
Tablo 3-3: Mikroemülsiyonların formülasyon çalışmalarında kullanılan bileşenler (yağ, sürfaktan, kosürfaktan ve oranları) 58
Tablo 3-4: Bir sürfaktan ve bir kosürfaktan içeren mikroemülsiyon formülleri 59
Tablo 3-5: İki kosürfaktan içeren mikroemülsiyon formülleri 60
Tablo 3-6: İki sürfaktan içeren mikroemülsiyon formülleri 60
Tablo 3-7: Merhemlerin formülasyonlarında kullanılan yağ, sürfaktan, çözücüler 61
Tablo 4-1: Takrolimusun yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü 94
Tablo 4-2: Fusidik asidin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü 95
Tablo 4-3: Etkin maddelerin reseptör fazlardaki çözünürlük bulguları 96
Tablo 4-4: Etkin maddelerin toplam safsızlık değerleri (%) 96
Tablo 4-5: Fiziksel karışımlarda etkin maddelerin toplam safsızlık değerleri (%) 97
Tablo 4-6: Fiziksel karışımlarda etkin maddelerin toplam safsızlık değerleri (%) 97
Tablo 4-7: Tek sürfaktan ve kosürfaktan içeren mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve dağılımı (PDI) sonuçları 98
Tablo 4-8: İki kosürfaktan içeren mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve dağılımı ölçüm (PDI) sonuçları 99

Tablo 4-9: İki sürfaktan içeren mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve dağılımı ölçüm (PDI) sonuçları 99
Tablo 4-10: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları 101
Tablo 4-11: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları 102
Tablo 4-12: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:2 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları 103
Tablo 4-13: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları 104
Tablo 4-14: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları 105
Tablo 4-15: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları 106
Tablo 4-16: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları 107
Tablo 4-17: Yağ fazı Capryol 90 olan mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzdeleri* 108
Tablo 4-18: Yağ fazı Oleik asit olan mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzdeleri 108
Tablo 4-19: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan çözücüsü Transcutol P ve Capryol 90 olan merhem formülasyonlarının kodları ve yüzdeleri 109
Tablo 4-20: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan çözücüsü Triasetin olan merhem formülasyonlarının kodları ve yüzdeleri 109
Tablo 4-21: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan çözücüsü Propilen karbonat olan merhem formülasyonlarının kodları ve yüzde miktarları 109

Tablo 4-22: Takrolimusun miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular 111
Tablo 4-23: Takrolimusun doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi 111
Tablo 4-24: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları..... 111
Tablo 4-25: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları 111
Tablo 4-26: Plasebo formülasyonların %100 konsantrasyonları için doğruluk çalışması 112
Tablo 4-27: Takrolimusun stabilite bulguları 112
Tablo 4-28: Fusidik asitin miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular……..113
Tablo 4-29: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi 114
Tablo 4-30: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları 114
Tablo 4-31: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları 114
Tablo 4-32: Fusidik asitin bant numunelerinden geri kazanımı 114
Tablo 4-33: Fusidik asitin deri numunelerinden geri kazanımı 115
Tablo 4-34: Fusidik asidin stabilite bulguları 116
Tablo 4-35: Fusidik asitin miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular……. 117
Tablo 4-36: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi 117
Tablo 4-37: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları 117
Tablo 4-38: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları 117
Tablo 4-39: Merhem plasebo formülasyonunun %100 konsatrasyonları için doğruluk çalışması..... 118
Tablo 4-40: Fusidik asitin stabilite bulguları 118
Tablo 4-41: Takrolimusun miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular 120
Tablo 4-42: Takrolimusun doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi 120
Tablo 4-43: Takrolimusun miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular 121
Tablo 4-44: Takrolimusun doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi 121

Tablo 4-45: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları..... 122
Tablo 4-46: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları 122
Tablo 4-47: Takrolimusun bant numunelerinden geri kazanımı 122
Tablo 4-48: Takrolimusun deri numunelerinden geri kazanımı 123
Tablo 4-49: CLT (1:2)-A mikromülsiyonunun stabilite çalışmasına ait ait geri kazanım (%) ve toplam safsızlık (%) bulguları..... 124
Tablo 4-50: CLT (1:2)-A mikroemülsiyonunun stabilite çalışmasına ait damlacık boyutu ve dağılımı ile pH bulguları 124
Tablo 4-51: CLT (1:2)-B mikroemülsiyonunun stabilite çalışmasına ait geri kazanım (%) ve toplam safsızlık (%)bulguları 125
Tablo 4-52: CLT (1:2)-B mikromülsiyonunun stabilite çalışmasına ait damlacık boyutu ve dağılımı bulguları 125
Tablo 4-53: Takrolimus ve Fusidik asit etkin maddelerinin bir arada yüklendiği mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzde aralıkları 126
Tablo 4-54: Takrolimus yüklenen mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzde aralıkları 127
Tablo 4-55: Takrolimus ve fusidik asit yüklü MR-TC-5 kodlu merhem formülasyonuna ait stabilite bulguları 128
Tablo 4-56: Takrolimus ve fusidik asit yüklü MR-TC-8 kodlu merhem formülasyonuna ait stabilite bulgular 128
Tablo 4-57: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü MR-TA-5 kodlu merhem formülasyonuna ait stabilite bulguları 129
Tablo 4-58: Optimizasyonu tamamlanan merhem formülasyonlarının bileşenleri ve yüzde değerleri 130
Tablo 4-59: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların refraktif indeks değerleri 131
Tablo 4-60: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların ait refraktif indeks değerleri..... 131
Tablo 4-61: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların pH değerleri 131
Tablo 4-62: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların pH değerleri 132
Tablo 4-63: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların iletkenlik değerleri 132
Tablo 4-64: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların iletkenlik değerleri 132

Tablo 4-65: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları 133
Tablo 4-66: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları 134
Tablo 4-67: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:2 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları devamı 135
Tablo 4-68: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları 136
Tablo 4-69: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları 137
Tablo 4-70: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları 138
Tablo 4-71: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları 139
Tablo 4-72: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların PS ve PDI değerleri 140
Tablo 4-73: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların PS ve PDI değerleri..... 140
Tablo 4-74: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların zeta potansiyeli değerleri 140
Tablo 4-75: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların zeta potansiyeli değerleri 141
Tablo 4-76: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların viskozite değerleri 141
Tablo 4-77: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların viskozite değerleri..... 141
Tablo 4-78: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatları ile gerçekleştirilen 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asit miktarları 143
Tablo 4-79: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatları ile gerçekleştirilen 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asidin toplam miktarları 143

Tablo 4-80: Takrolimus yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatı ile gerçekleştirilen 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmasını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus miktarı 143
Tablo 4-81: ATR-FTIR sonuçlarına göre bant değişimleri 146
Tablo 4-82: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun geri kazanım, toplam safsızlık ve fiziksel özelliklerine ait başlangıç bulguları 150
Tablo 4-83: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasının takrolimus için geri kazanım bulguları (%) 150
Tablo 4-84: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasının fusidik asit için geri kazanım bulguları (%) 151
Tablo 4-85: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait toplam safsızlık bulguları (%) 151
Tablo 4-86: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait viskozite bulguları (cP) 151
Tablo 4-87: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait iletkenlik bulguları (µS/cm) 152
Tablo 4-88: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait pH bulguları 152
Tablo 4-89: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait damlacık boyutu bulguları (nm) 152
Tablo 4-90: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait polidispersite indeksi bulguları 153
Tablo 4-91: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait zeta potansiyeli bulguları (mV) 153
Tablo 4-92: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait refraktif indeks bulguları 153
Tablo 4-93: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının geri kazanımlarına ve fiziksel özelliklerine ait başlangıç bulguları 154
Tablo 4-94: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının geri kazanımlarına ait stabilite bulguları 154
Tablo 4-95: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının viskozite ölçümlerine ait stabilite bulguları (cP) 155

Tablo 4-96: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının iletkenlik ölçümlerine ait stabilite bulguları (µS/cm) 155
Tablo 4-97: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının pH ölçümlerine ait stabilite bulguları 155
Tablo 4-98: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutlarına ait stabilite bulguları (nm) 156
Tablo 4-99: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının polidispersite indekslerine ait stabilite bulguları 156
Tablo 4-100: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyellerine ait stabilite bulguları (mV) 156
Tablo 4-101: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının refraktif indeks ölçümlerine ait stabilite bulguları 157
Tablo 4-102: Biyofiziksel ölçümlerin uygulama öncesi sonuçları (bazal değerler) 157
Tablo 4-103: Biyofiziksel ölçümlerin uygulama sonrası sonuçları 158
Tablo 4-104: ATR-FTIR ölçümlerin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları 160
Tablo 4-105: Optimizasyonu tamamlanan merhem formülasyonlarının pH ve viskozite ölçüm sonuçları 161
Tablo 4-106: Takrolimus ve Fusidik asit yüklenen merhem formülasyonlarının geri kazanım, toplam safsızlık ve fiziksel özelliklerine ait başlangıç bulguları 162
Tablo 4-107: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının takrolimus için geri kazanım bulguları (%) 162
Tablo 4-108: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının fusidik asit için geri kazanım bulguları (%) 163
Tablo 4-109: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait toplam safsızlık bulguları (%) 163
Tablo 4-110: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait viskozite bulguları (cP) 163
Tablo 4-111: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait pH bulguları 164
Tablo 4-112: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının takrolimus için geri kazanım bulguları (%) 164
Tablo 4-113: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının fusidik asit için geri kazanım bulguları (%) 164

Tablo 4-114: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait toplam safsızlık bulguları (%) 165
Tablo 4-115: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun çalışmasına ait viskozite bulguları (cP) 165
Tablo 4-116: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait pH bulguları 165
Tablo 4-117: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Protopic® merhem ve sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonlarından takrolimusun *in vitro* salım bulguları 166
Tablo 4-118: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Fucidin® merhem ve sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarından fusidik asidin *in vitro* salım çalışmaları bulguları 167
Tablo 4-119: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatları ile yapılan 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asit miktarları 169
Tablo 4-120: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatları ile yapılan 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asitin toplam miktarları 169
Tablo 4-121: ATR-FTIR sonuçlarına göre bant değişimleri 171

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Derinin yapısı ve tabakaları 5
Şekil 2-2: Epidermisin tabakaları 6
Şekil 2-3: Deriden geçiş yolları: a) Yan geçit yolu b) Hücre içi yol c) Hücrelerarası yol 9
Şekil 2-4: AD gelişiminde immünolojik süreç 13
Şekil 2-5: Aktif serin proteazların *stratum corneum* fonksiyonlarını etkileyen mekanizmaları 15
Şekil 2-6: Bozulmuş epidermal bariyer alerjenlerin girişine izin verir ve nem kaybına neden olur. 16
Şekil 2-7: Takrolimus'un kimyasal yapısı 22
Şekil 2-8: Fusidik asit'in kimyasal yapısı 25
Şekil 2-9: Y/S, Bicontinuous, S/Y Mikroemülsiyonların şematik gösterimi 32
Şekil 2-10: Yağ, su ve sürfaktandan faz diyagramı 37
Şekil 2-11: Yağ, su ve sürfaktandan oluşan üçlü karışımın sıcaklığın ve sürfaktan miktarının bir fonksiyonu olarak faz davranışı 38
Şekil 2-12: Bantla soyma yönteminin şematik gösterimi 46
Şekil 4-1: Takrolimusun (A), fusidik asidin (B) ve her iki etkin maddenin fiziksel karışımının (C) IR spektrumu 92
Şekil 4-2: Takrolimus (I) ve Fusidik asidin (II) DSC termogramları 93
Şekil 4-3: Takrolimus ve Fusidik asit karışımının DSC termogramı 93
Şekil 4-4: Takrolimusun yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü 94
Şekil 4-5: Fusidik asidin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü 95
Şekil 4-6: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı 101
Şekil 4-7: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı 102
Şekil 4-8: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol/Transcutol P oranı 1:2 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı 103
Şekil 4-9: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı 104

Şekil 4-10: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı 105
Şekil 4-11: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı 106
Şekil 4-12: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı 107
Şekil 4-13: Takrolimusun doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği 110
Şekil 4-14: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği 113
Şekil 4-15: Fusidik asitin seçicilik çalışması ile elde edilen blank, boş deri, boş bant ve 100 µg/mL'lik standart çözeltilerine ait çakıştırılmış kromatogramlar 115
Şekil 4-16: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği 116
Şekil 4-17: Takrolimusun doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği 119
Şekil 4-18: Takrolimusun doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği 121
Şekil 4-19: Takrolimusun seçicilik çalışması ile elde edilen blank, boş deri, boş bant ve 250 ng/mL'lik standart çözeltilerine ait kromatogramlar (ECI'ya göre) (ECI: Extracted ion chromatogram: Ekstrakte iyon kromatogramı) 123
Şekil 4-20: Takrolimusun seçicilik çalışması ile elde edilen blank, boş deri, boş bant ve 250 ng/mL'lik standart çözeltilerine ait kromatogramlar (TIC'ye göre) (TIC: The total ion current chromatogram: Total iyon kromatogramı) 123
Şekil 4-21: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri 133
Şekil 4-22: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri 134
Şekil 4-23: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:2 olan mikroemülsiyonuneklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri 135
Şekil 4-24: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümler 136
Şekil 4-25: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri 137
Şekil 4-26: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümler 138
Şekil 4-27: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri 139

Şekil 4-28: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ile piyasa preparatının (Protopic® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben takrolimusun deri tabakalarındaki birikim miktarları 144
Şekil 4-29: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ile piyasa preparatının (Fucidin® krem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben fusidik asitin deri tabakalarındaki birikim miktarları 144
Şekil 4-30: Takrolimus yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatının (Protopic® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben takrolimusun deri tabakalarındaki birikim miktarları 145
Şekil 4-31: Nil kırmızı yüklü CLT (1:2), OLT-CEL ve OTT-PEG mikroemülsiyonları ile PBS süspansiyonunun uygulandığı domuz derilerinin xz ekseninde alınan kesitlerine ait CLSM görüntüleri A) Nil kırmızısı yüklü PBS süspansiyonu uygunan deriye ait görüntü B) Nil kırmızısı yüklü CLT (1:2) mikroemülsiyonu uygunan deriye ait görüntü 147
Şekil 4-31: Nil kırmızı yüklü CLT (1:2), OLT-CEL ve OTT-PEG mikroemülsiyonları ile PBS süspansiyonunun uygulandığı domuz derilerinin xz ekseninde alınan kesitlerine ait CLSM görüntüleri C) Nil kırmızısı yüklü OLT-CEL mikroemülsiyonu uygunan deriye ait görüntü D) Nil kırmızısı yüklü OTT-PEG mikroemülsiyonu uygunan deride kıl kökünde birikime ait görüntü..... 148
Şekil 4-31: Nil kırmızı yüklü CLT (1:2), OLT-CEL ve OTT-PEG mikroemülsiyonları ile PBS süspansiyonunun uygulandığı domuz derilerinin xz ekseninde alınan kesitlerine ait CLSM görüntüleri E) Nil kırmızısı yüklü OTT-PEG mikroemülsiyonu uygunan deriye ait görüntü 149
Şekil 4-32: Korneometre ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları 158
Şekil 4-33: pH ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları..... 158
Şekil 4-34: TEWL ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları ($g.h/m^2$) 159
Şekil 4-35: Mexameter (Eritem) ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları . 159
Şekil 4-36: Mexameter (Melanin) ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları 159
Şekil 4-37: ATR-FTIR ölçümlerinde asimetrik gerilme bantlarının uygulama öncesi ve sonrası sonuçları 160
Şekil 4-38: ATR-FTIR ölçümlerinde simetrik gerilme bantlarının uygulama öncesi ve sonrası sonuçları 161

Şekil 4-39: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Protopic® merhem ve sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonlarından takrolimusun Fick'in Birinci Yasası'na göre *in vitro* salım profilleri 166
Şekil 4-40: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Protopic® merhem ve sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonlarından takrolimusun Higuchi Kinetik modeline göre *in vitro* salım profilleri 167
Şekil 4-41: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Fucidin® merhem ve sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarından fusidik asidin Fick'in Birinci Yasası'na göre *in vitro* salım profilleri 168
Şekil 4-42: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Fucidin® merhem ve sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarından fusidik asidin Higuchi Kinetik modeline göre *in vitro* salım profilleri 168
Şekil 4-43: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatının (Protopic® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben takrolimusun deri tabakalarındaki birikim miktarları 170
Şekil 4-44: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatının (Fucidin® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben fusidik asidin deri tabakalarındaki birikim miktarları 170

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AD: Atopik Dermatit

APG: Alkil Poli Glizotler

ATR-FTIR: Hafifletişmiş Toplam Yansımalı Kızılötesi Spektroskopisi (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

BALB/c: Ev faresinin laboratuvarda yetiştirilen suşu,

CERs: Seramitler

CHOL: Kolesterol

CLSM: Laser taramalı konfokal mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscopy)

DLS: Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering)

DPK: Dermatofarmakokinetik,

EP: Avrupa Farmakopesi

FDA: Amerika Gıda ve İlaç Dairesi

FFAs: Doymuş Uzun Zincirli Yağ Asitleri

FF-TEM: Dondurarak Kurutma Transmisyon Elektron Mikroskobu (Freeze-Fracture Transmission Electron Microscope)

GS: Gama Sintigrafi Yöntemi

h:h : Hacim/Hacim

HET-CAM: Tavuk yumurtası-korioallantoik membran testi (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane)

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

ICH: Uluslararası Uyum Harmonizasyonu

IgE: İmmünoglobulin E

IL: İnterlökin

INF-γ: İnterferon-γ

KM: Kun Ming

KoS: Kosürfaktan

LC-MS: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi

LEKTI 1: Lenfoepitelyal Kazal-Tip İnhibitör/Lympho-Epithelial Kazal-Type-Related Inhibitor

MTL: Miktar Tayini Limiti

NaCI: Sodyum Klorür

NMF: Doğal Nemlendirici Faktör (Natural Moisturizing Factor)

PBS: Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)

PCA: Prolidin-5-Karboksilik Asiti

PDI: Polidisperiste İndeksi (Polydispersity Index)

PEG: Polietilen glikol

r^2 : Determinasyon Katsayısı

RI: Refraktif Indeks (Refractive Index)

RSD: Relatif Standart Sapma

S. aureus: Staphylococcus aureus

S/Y: Yağ İçinde Su

S: Sürfaktan

SANS: Küçük Açılı Nötron Saçılımı (Small Angle Neutron Scattering)

SAXS: Küçük Açılı X Işını Saçılımı (Small Angle X-Ray Scattering)

SC: *Stratum Corneum*

SCCE: *Stratum Corneum* Kimotriptik Enzim

SCTE: *Stratum Corneum* Triptik Enzim

SD : Standart Sapma

SD: Sprague Dawley,

SLS: Statik Işık Saçılımı (Static Light Scattering)

SP: Serin Proteaz

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu(Transmission Electron Microscope)

TEWL: Transepidermal su kaybı,

TL: Teşhis Limiti

TNF-α: Tümör Nekroz Faktörü- α

UCA: Urokanik Asit

USP: Amerika Farmakopesi

UV: Ultraviyole Işın

Y/S: Su İçinde Yağ

TSLP: Timik stromal lenfopoietin

ÖZET

Güngördük, S. (2017). Atopik Dermatit Tedavisine Yönelik Topikal Nano İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Optimizasyonu, In Vitro/In Vivo Değerlendirilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

Atopik Dermatit (AD), immünolojik değişimlerin eşlik ettiği, derinin bariyer özelliğinin bozulması ile gelişen, enflamasyon, kuruluk ve bakteri enfeksiyonu ile tanımlanan kronik bir deri hastalığıdır. Topikal ve sistemik immunomodülatörler AD tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca, hastalığın seyrine bağlı olarak gelişen ikincil enfeksiyonların baskılanması için topikal antibiyotik tedavisi de yapılmaktadır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı, takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin derideki patolojik bölgelere (epidermal veya dermal) taşınabilmesini iyileştiren ve AD hastalığının topikal tedavisinde etkinlik ve uygulama kolaylığı açısından yenilikçi topikal formülasyonların geliştirilmesidir.

Bu kapsamda; takrolimusu tek ve takrolimus ile fusidik asidi birlikte içeren, özellikle takrolimusun derinin daha derin tabakalarına ulaşmasını sağlayan nano boyutlu koloidal ilaç taşıyıcı sistemlerinden mikroemülsiyon formülasyonları geliştirildi. Ayrıca, her iki etkin maddeyi birlikte içeren, yüksek oklüzif etkiye sahip konvansiyonel merhem formülasyonları da geliştirildi. Mikroemülsiyon ve merhem formülasyonlarının fizikokimyasal özellikleri, fiziksel ve kimyasal stabiliteleri değerlendirildi. Optimize edilen mikroemülsiyon ve merhem formülasyonlarının deri üzerindeki etkileri ATR-FTIR spektroskopisiyle incelendi. Her iki etkin maddenin deri tabakalarındaki dağılımı in vitro penetrasyon çalışmalarının ardından uygulanan bantla soyma yöntemiyle kantitatif olarak saptandı. Takrolimus gibi lipofilik karakterde bir model boyanın (Nil Kırmızısı) optimize edilen mikroemülsiyonlar ile uygulandığında, model boyanın deriden penetrasyon derinliği ve derinin tabakalarındaki yayılabilirliği CLSM görüntüleme tekniği ile gösterildi. Ayrıca, optimize edilen mikroemülsiyonun deri üzerindeki etkileri biyofiziksel yöntemler ile in vivo olarak sağlıklı gönüllüler üzerinde değerlendirildi.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; takrolimusu tek, takrolimus ile fusidik asiti birlikte içeren mikroemülsiyon ve her iki etkin madddeyi bir arada içeren merhem formülasyonları da geliştirilerek, AD hastalığının tedavisine yönelik her iki etkin maddenin pazarda bulunan preparatlarına alternatif yenilikçi ürünleri sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Atopik dermatit, Takrolimus, Fusidik asit, Mikroemülsiyonlar, Topikal İlaç Taşıyıcı Sistemleri

Bu çalışma, Bilim Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından San-Tez Programı kapsamında desteklenmiştir. SANTEZ Proje Kod No: 01532.STZ.2012-2. Tez projesi, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından da desteklenmiştir. Proje No: 21220.

ABSTRACT

Gungorduk, S. (2017). Optimization Of Nano-Sized Topical Drug Carriers For Treatment Of Atopic Dermatitis, In Vitro/In Vivo Evaluation. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Technology, Doctoral Thesis, Istanbul.

Atopic dermatitis (AD) is a chronic skin disease accompanied by immunological alterations and defects in skin barrier. It is identified inflammation, dryness, bacterial infection. Topical and systemic immunomodulatory drugs have been used for the treatment of AD. Topical antibiotic treatments have been used to inhibit seconder infections which are observed due to progress of disease.

The aim of this study is to develop innovative topical formulations which improve transport of tacrolimus and fusidic acid into the pathologic regions on the skin and also which are effective and easy for topical application in AD therapy.

In this context, microemulsions, nano-sized colloidal carriers, were developed with either tacrolimus or combination of tacrolimus and fusidic acid to improve delivery of tacrolimus into skin. The conventional highly occlusive ointments composed both drugs were also developed. Physical and chemical stability of microemulsions and oinments was investigated. The effects of formulations on porcine skin were determined using ATR-FTIR. The localization of both drugs in the skin was quantified by tape stripping-technique subsequent to in vitro penetration studies. Visualization of the distribution of tacrolimus into the skin layers were performed with CLSM using microemulsions labelled with Nile Red which has similar lipophilicity with tacrolimus. Furthermore, effects of microemulsion on skin surface were investigated with biophysical methods in healthy volunteers.

Based on the data, microemulsions consisting of either tacrolimus or combination of tacrolimus and fusidic acid, ointments of both drugs were developed and were proposed as alternative to commercial products of both drugs for the treatment of AD.

Key Words: Atopic dermatitis, Tacrolimus, Fusidic acid, Microemulsions, Topical Drug Delivery Systems

The present work was supported by Republic of Turkey, Ministry of Science, Industry and Technology. SAN-TEZ Project No: 01532. STZ. 2012-2. Thesis project also was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 21220.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Atopik dermatit (AD) immünolojik değişimlerin eşlik ettiği, derinin bariyer özelliğinin bozulması ile gelişen, enflamasyon, kuruluk ve bakteri enfeksiyonu ile tanımlanan kronik bir deri hastalığıdır (Saeki ve ark. 2016). AD, gerek genetik gerekse çevresel faktörlerin birbiri ile etkileşimi sonucu gelişen karmaşık bir hastalık olarak da tanımlanır (Bieber 2007). AD gelişiminde rol oynayan faktörler; derinin bariyer bozukluğu (*proteazlar, filaggrin, lorikrin, involukrin*), alerji kaynakları (yumurta, inek sütü, ev tozu akarı), otoimmün reaksiyonlar (anti-keratinosit antikorları) ve mikroorganzima kolonizasyonu *(Staphylococcus aureus)* olarak sıralanır (Van Bever ve Llanora 2011). AD yaygınlığının gelişmiş ülkelerde yaşayan çocuklarda yaklaşık %15-30 ya da %20; erişkinlerde ise %2-10 ya da %1-3 olduğu bildirilmektedir (Bieber 2010; Ring ve ark. 2012).

Etkin bir AD tedavisi kısa dönemdeki alevlenmelerin kontrol altına alınması, uzun dönemde ise alevlenmeleri en aza indirilmesi için, derinin en üst tabakası olan *stratum corneum* (SC) un deriyi koruyucu özelliği ve bütünlüğünün yeniden kazandırılmasını sağlayacak şekilde planlanması önerilmektedir (Simpson 2010). Tedavide öncelikle hastalığı tetikleyici çevresel alerjenlerin belirlenmesi ve bunlardan kaçınılması tavsiye edilir. Stresle başa çıkabilmek için psikolojik desteğin de tedaviye eklenebileceği belirtilir (Plötz ve Ring 2010). Akut ve kronik AD vakalarında öncelikle topikal tedavi uygulanır, ancak hastalığın çok şiddetli olduğu durumlarda fototerapi veya sistemik tedavi de uygulanabilmektedir (Walling ve Swick 2010).

Dermatolojik hastalıkların tedavisinde topikal uygulama, derideki patolojik bölgelerin hedef alındığı ve en az düzeyde sistemik absorpsiyonun sağlandığı bir tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (Brown ve ark. 2006 ; Colin Long 2007 p.41). AD hastalığının topikal tedavisi; kaşıntı ve enflamasyonun giderilmesinin yanında, hastalıkta ikincil olarak gelişen deri enfeksiyonlarının giderilmesini de kapsar (Akdiş ve ark. 2006).

Topikal kortikosteroitler hastalığın akut alevlenmelerinin tedavisinde yarar/risk oranı dikkate alınarak kısa süreli yer almaktadır (Akdiş ve ark. 2006). Bunun nedeni topikal kortikositeroitlerin uzun süreli kullanımlarına bağlı gelişen *(telenjiektazi, stria, deri atrofisi ve dispigmentasyon, anaflaksi ile kontakt alerji)* ve aşırı kullanımlarına bağlı

oluşan *(hipofiz bezinini baskılanmasıyla tetiklenen Cushing sendromu)* yan etkilerdir (Gutfreund ve ark. 2013).

Pimekrolimus ve takrolimus topikal AD tedavisinde FDA onaylı kalsinörin inhibitörleridir (Plötz ve Ring 2010). AD'nin ikinci basamak tedavisinde topikal kortikosteroit tedavisine yanıt vermeyen veya topikal kortikosteroitlerin uygun olmadığı hastalarda kalsinörin inhibitörleri önerilmektedir (Simpson 2010). AD hastalığında akut alevlenmeler ile bakteri kaynaklı süper enfeksiyonların neden olduğu impetiginizasyonu tedavi etmek için topikal antiseptikler ve antibiyotik (fusidik asit) kremleri de tedaviye eklenmektedir (Plötz ve Ring 2010).

Takrolimus, *Streptomyces tsukubaensis* isimli bir bir toprak bakterisinden fermente edilen makrolit lakton yapısında immünosüpresan etkili bir ilaçtır (Ruzicka ve ark. 1999; Gupta ve ark. 2002). Organ nakli yapılan hastalarda dokunun reddinin önlenmesi (Ruzicka ve ark. 1999; Cather ve ark. 2001) yanında, AD, kontakt dermatit ve *psöriasis* gibi enflamasyonlu deri hastalıklarının tedavisinde, sistemik ve topikal olarak da kullanılmaktadır (Ruzicka ve ark. 1999; Assmann ve ark. 2000; Gupta ve ark. 2002).

Takrolimus, kalsinörin inhibisyonuna yol açarak enflamatuvar sitokinlerin salımını engeller (Gutfreund ve ark. 2013). Takrolimusun *T* lenfositleri ve mast hücreleri, eozinofilleri, bazofilleri ve en önemlisi *Langerhans* hücrelerini etkilediği; endotel hücrelere ve fibroblastlara etki etmediği bildirilmiştir (Nghiem ve ark. 2002). Bu nedenle, topikal steroitlerle oluşan deri atrofisi, kalsinörinin kolajen sentezinde rol oynamamasından dolayı takrolimus ile meydana gelmez (Bekersky ve ark. 2001).

Fusidik asit, *Fusidium coccineum'*un fermentasyon ürünlerinden izole edilen fusidan yapılı bir antibiyotiktir. Bakterilerde protein sentezini ribozomlara bağlanmadan inhibe ettiği belirtilmiştir (Rigopoulos ve Larios 2008). AD ve kontakt dermatit gibi derideki problemli durumlar sonucu ortaya çıkan ikincil enfeksiyonların tedavisinde kullanılmasının etkin ve güvenilir olduğu bildirilmiştir (Long 2008).

AD tedavisinde, topikal korkositeroitler, topikal kalsinörin inhibitörleri ve UV ile sağlanan antienflamatuvar etkinin, ayrıca sitafilokok kolonizasyonunu azalttığı da bildirilmiştir. Bu durum, *Staphylococcus aureus* kolonizasyonunun daha yüksek olduğu AD hastalarında kortikosteroitler ile antibakteriyel ilaçların birlikte kullanılmasına yol açmıştır (Darsow ve ark. 2010).

AD tedavisinde kullanılan hidrokortizon asetat, betametazon valerat ve mometazon furoat gibi kortikosteroitlerin fusidik asit ile kombine, topikal uygulamaya yönelik konvansiyonel krem dozaj formları ilaç pazarında mevcuttur (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017). Ancak, kalsinörin inhibitörlerinin fusidik asit ile kombine ticari bir preparatı pazarda mevcut değildir. Ayrıca, takrolimusun merhem, fusidik asit/sodyum fusidat'ın krem ve merhem dozaj formları şeklinde müstahzarları pazarda mevcuttur (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017).

Mikroemülsiyonlar, yağ, su, sürfaktan ve kosürfaktan bileşenlerinden oluşan yüzeyler arası bir film ile stabilize edilmiş, termodinamik açıdan kararlı, saydam, izotropik ve düşük viskoziteli koloidal dispersiyonlardır (Djekic ve ark. 2012; Fanun 2012; Kalaitzaki ve ark. 2014). Mikroemülsiyonlar, hem hidrofilik hem de lipofilik karakterdeki etkin maddeler için yüksek oranda çözündürme kapasitesine sahiptir; bu sayede etkin maddelerin deriden geçişini de artırırlar (Neubert 2011; Hathout ve Nasr 2013). Etkin penetrasyon artırıcı etki gösteren bileşenlerden oluşan mikroemülsiyonlar aynı zamanda deri yüzeyine yüksek oranda temas etmelerini sağlayan düşük yüzey gerilimleri sayesinde deriye iyi penetre olurlar (Heuschkel ve ark. 2008; Hathout ve Elshafeey 2012). Bu nedenle, mikroemülsiyonlar yüksek molekül ağırlıklı ve lipofilik maddelerin *stratum corneum* ve daha derin deri tabakalarına ulaşmasını sağlayarak deriden geçişin artırılmasına yönelik yaklaşımlar arasında yer alırlar (Goebel ve ark. 2011).

Merhemler, yarı katı preparatlar olarak sahip oldukları örtücü (oklüzif) özellikleri nedeniyle, ekzema, *psöriasis* ve dermatit gibi kronik dermatolojik bozuklukların tedavisinde sıklıkla tercih edilirler. Merhemlerin sağladığı örtücü etki, özellikle emoliyentler olarak son derece yararlı olmakla birlikte, derideki hidrasyonu artırarak hidrokarbon bazlı merhemlerde etkin maddenin permeasyonunu da artırabilmektedir (Williams 2003 p.173).

Deri kanseri, akne, *psöriasis,* dermatit, mikrobiyal ve mantar enfeksiyonlarında deriye topikal ilaç uygulanmasının esas amacı, etkin maddenin derideki patolojik bölgelere (*epidermis* veya *dermis*) taşınabilmesi ve aynı zamanda sistemik absorpsiyonun en aza indirilmesidir (Brown ve ark. 2006). Dolayısı ile topikal uygulanan ürünlerin formülasyon optimizasyonundaki temel yaklaşım; derinin hedef tabakalarında beklenen ilaç konsantrasyonlarının sağlanması ile etkin bir tedavi gerçekleştirilirken en az düzeyde

sistemik etki sağlanmasıdır (Shah ve Williams 2014 p. 61). Bu nedenle, topikal uygulanan ürünlerin geliştirilmesi için formülasyonlardan serbestleşen etkin maddenin derinin tabakalarındaki dağılımının ve lokalizasyonunun değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı; tek takrolimus ve takrolimus ile fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren, topikal uygulamaya yönelik yenilikçi mikroemülsiyon sistemlerinin geliştirilmesi, geliştirilen mikroemülsiyonların fizikokimyasal özelliklerinin araştırılması, optimize edilen formülasyonların fiziksel ve kimyasal stabilitelerinin izlenmesi, *in vitro* penetrasyon çalışmalarının ardından bantla soyma yöntemi kullanılarak (*tape stripping*) etkin maddelerin derinin farklı tabakalarında dağılımlarının kantitatif olarak değerlendirilmesi, mikroemülsiyonların deri üzerindeki oluşturdukları etkilerin ATR-FTIR spektrometresi ile incelenmesi, CLSM görüntüleme tekniği ile takrolimus gibi lipofilik karakterde bir model flüoresan maddenin (Nil Kırmızısı) optimize edilen mikroemülsiyonlar ile deri üzerine uygulandığında, model boyanın deriden penetrasyon derinliği ve derinin tabakalarındaki dağılımı ve lokalizasyonu hakkında bilgi sağlanması, ayrıca *in vitro* çalışmalar doğrultusunda seçilen mikroemülsiyonun deri üzerindeki etkilerinin biyofiziksel yöntemler ile *in vivo* sağlıklı gönüllüler üzerinde incelenmesidir.

Aynı zamanda takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren oklüzif özelliği yüksek olan merhem formülasyonlarının da geliştirilmesi, bu formülasyonların fizikokimyasal özellikleri ile stabilitelerinin değerlendirilmesi, sentetik membranlar kullanılarak optimize edilen merhem formülasyonlarından etkin maddelerin salım karakteristiğinin incelenmesi, *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarıyla etkin maddelerin deriden penetrasyon derinliği ve birikimi ile ATR-FTIR analizleriyle formülasyon bileşenlerinin deri üzerindeki etkileri hakkkında bilgi sağlanması da amaçlanmıştır.

Sonuç olarak tez kapsamında yürütülen çalışmalar ile; AD tedavisine yönelik özellikle takrolimusun, derinin hedef tabakalarındaki lokalizasyonunu ve dağılımının iyileştirildiği, takrolimus ile fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren pazarda mevcut preparatlarına alternatif teşkil edecek yenilikçi topikal ürünlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

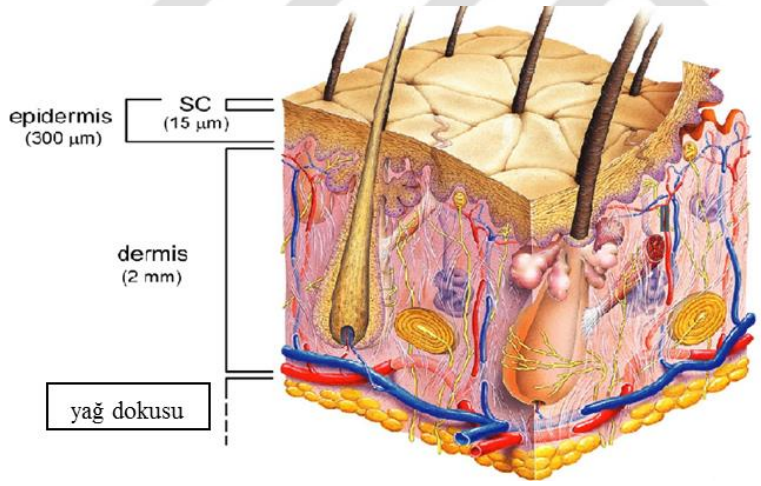
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Derinin Yapısı ve Genel Özellikleri

İnsan derisi, yaşamın devamı için olan önemli gereklilikleri sağlayan ortalama 1,7 m^2 yüzey alanında, organizmanın en büyük organıdır (Benson 2012 p.3). Deri, vücut ve dış çevre arasında bariyer özellik sağlar. Deri bariyeri ultraviyole (UV) radyasyonun, kimyasal maddelerin, alerjenlerin, mikroorganizmaların permeasyonunu önler. Deri vücut sıcaklığını düzenlemesinde ve kan basıncını kontrolünde rol oynayarak *hemostasis*'in devamlılığını sağlar. Aynı zamanda sıcaklık, basınç ve acı gibi çevresel uyarıları hisseden önemli bir duyu organıdır (Walters ve Roberts 2007 p.1; Benson 2012 p.3).

Deri, yapısal olarak üç tabakadan oluşur. Bu tabakalar, en alttan yukarı doğru sırası ile; deri altı *hipodermis* (yağ tabakası), *dermis* (*corium*) ve *epidermis* olarak isimlendirilir (Benson 2012 p.3)



Şekil 2-1: Derinin yapısı ve tabakaları (Bouwstra 2011 p.9)

2.1.1.1. Hipodermis (Deri Altı Yağ Tabakası)

Dermis ile vücut bileşenleri arasında bir köprü görevi yapan, vücudun fiziksel darbelere karşı mekanik olarak korunmasını sağlayan adipoz dokudur. Vücudun bir çok bölgesinde kalın olan bu doku, göz kapaklarında bulunmaz. Kan damarları ve sinirler bu tabakada yer alır (Williams 2003 p.2).

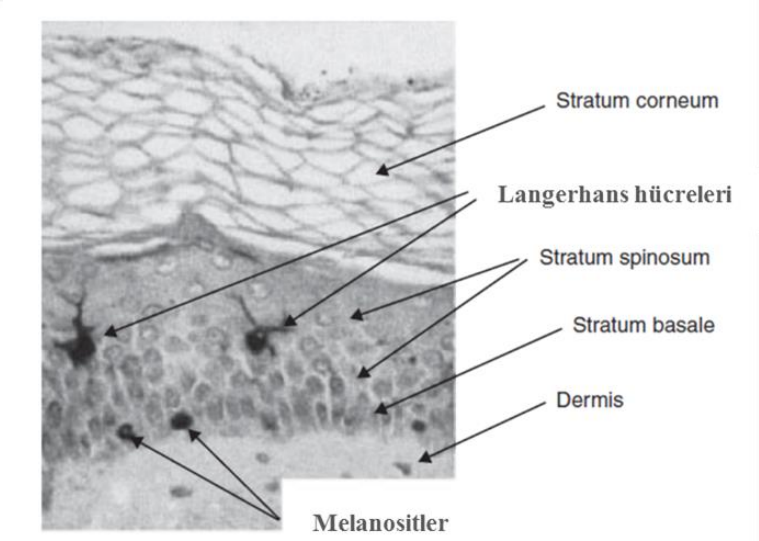
2.1.1.2. Dermis (*Corium*)

Dermis %70'i mukopolisakkarit jel matriks içine gömülü ve dokuya elastikiyet sağlayan kolojen liflerden oluşan 3-5 mm kalınlığındaki tabakadır. Dermiste bulunan temel hücreler fibroblastlar olup kolojen, laminin, fibronektin ve vitronektin gibi bağlayıcı doku bileşenlerini üretir. Dermiste bulunan diğer hücreler immün ve enflamatuvar yanıt oluşturan mast hücreleri ile deriye rengini sağlayan melanin pigmentini üreten melanosit hücreleridir (Walters ve Roberts 2007 p.11).

Kıl folikülleri ve sebum bezleri, ekrin bezler ve apokrin bezler bu tabakadadır. Sebum bezlerinden salgılanan sebumun yapısıda, mum, serbest yağ asitleri ve trigliseritler bulunur. Deri yapısındaki bu maddeler, deri yüzeyinin kaygan olmasını ve pH'sının yaklaşık 5 olmasını sağlar (Williams 2003 p.4).

2.1.1.3. Epidermis

Epidermis 0,06-0,8 mm kalınlığında, derinin düzenli olarak kendisini yenileyen bir tabakasıdır. Çok katmanlı bir yapıya sahip olan e*pidermis* alttan üste doğru sırası ile, *stratum basale (stratum germinativum), stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum ve stratum corneum* olmak üzere 5 tabakadan oluşur (Williams 2003 p.5).



Şekil 2-2**: Epidermisin tabakaları (Benson 2012 p.5)**

Stratum basale, mitokondri ve ribozom gibi organelleri olan *keratinosit* adı verilen aktif hücrelerden oluşur. Keratinositler *desmozom* olarak adlandırılan protein yapısındaki hücresel köprülerle birbirlerine bağlıdır. Bazal tabakada, melanositler, *Langerhans* hücreleri ve *Merkel* hücreleri de bulunur (Williams 2003 pp.5-8).

Langerhans hücreleri en büyük antijen sağlayan dendritik hücrelerdir. Bu hücreler, kemik iliğinde üretildikten sonra epidermiste bazal tabakada lokalize olurlar. Hücre yüzeyine bir antijen bağlandığında ise aktive olurlar ve epirdermisten dermise doğru göç ederek, lenf nodüllerine ulaşırlar ve *T* hücrelerini duyarlı hale getirirler. Böylece deri yolu ile immün yanıt oluşur (Benson 2012 pp.5-6).

Stratum spinosum epidermisin farklılaşma sürecinde, keratinositlerin keratin sentezlemeye ve yapısal olarak farklılaşmaya başladıkları tabakasıdır. *Stratum granulosum* keratinositlerin keratin sentezlemeye, yapısal olarak farklılaşmaya devam ettikleri ve yassılaşmaya başladıkları tabakadır (Williams 2003 p.8).

Stratum corneum (SC) 10-20 μm kalınlığında, yüksek yoğunlukta (1,4 g/cm^3) ve oldukça az miktarda su içeren (%10-%20, diğer vücut hücreleri yaklaşık %70 su içerir) epidermisin en dış tabakasıdır (Benson 2012 p.7). Derinin bariyer fonksiyonundan sorumlu tabakası olarak tanımlanan SC; yaklaşık %5-15 oranında lipit, %75-80 protein ve %5-10 bilinmeyen bileşenlerinden oluşur (Hatfield ve Fung 1995).

SC'da bulunan *korneosit*ler keratin filametleri, su ve doğal nemlendirici faktörü içeren yassılaşmış ölü hücrelerdir (Harding ve ark. 2000). Korneositlerin çevresi yoğun olarak çapraz bağlı protein yapısında olan ve hücre zarfı "*cell envelope*" olarak isimlendirilen bir tabaka ile örtülüdür. Tek sıralı lipit tabaka ise bu protein tabakaya kimyasal olarak kovalent bağlıdır (Rawlings 2003). Lipit tabaka, hidrofilik korneositler ile lipofilik ekstraselüler lipit matriks arasında ara yüzey oluşturarak SC için kritik bir rol üstlenir. Bununla birlikte *korneodesmozom*lar da korneositlerin birbirine tutunmasını sağlayarak SC'un kohezyonunda önemli oynar (Bouwstra ve Gooris 2010).

SC'da aslında düşük bir orana sahip hücrelerarası lipit bölge, ilaç moleküllerinin deriden geçişi için sürekli olan kıvrımlı ve ana geçiş yoludur (Ponec ve ark. 2003). SC'da temel lipitler; seramitler (CERs), kolesterol (CHOL) ve doymuş uzun zincirli yağ asitlerinden (FFAs) oluşur. Bu lipitler arasında oran yaklaşık olarak eşittir (Weerheim ve Ponec 2001). Ayrıca, daha düşük oranlarda, kolesterol sülfat, glukoseramitler ve kolesterol esterler gibi diğer lipitler de bulunur (Bouwstra ve Gooris, 2010).

Seramitlerin baş grupları çok küçüktür ve birbirine komşu moleküller ile yan yana olan hidrojen bağlarının meydana getirdiği fonksiyonel grupları içerir. Seramitler birbirlerinden farklı yapıya sahip baş grupları ile yağ asidi zincirinin uzunluğuna göre ayrılır. Temel olarak sfingozin (S), fitosfingozin (P), 6-hidroksifingozin (H)

dihidroksisfingozin (D) yapılarından birini içerir. Temel kısmın kimyasal olarak bağlı olduğu yağ asiti de üç farklı yapı gösterir. Bunlar hidroksilenmemiş yağ asiti (N), α-hidroksi yağ asiti (A) veya ω- hidroksi yağ asiti (EO)' dir. Tüm bu temel yapı ve yağ asitleri bir zincir uzunluk dağılımı gösterir. Dört temel kısım N ve A yağ asitleri ile eşlendirildiğinde 8 seramit yapısı aşığa çıkar ve bunlar; AS, AP, AH, AD ve NS, NP, NH ve ND olarak isimlendirilir. Ω- hidroksi yağ asiti 34 karbounlu olup oldukça uzun zincir uzunluğuna sahiptir. Ayrıca bu yağ asidine linoleik asit ester bağı ile bağlıdır. Bu grup EO olarak adlandırılır ve seramitler EOS, EOH ve EOP olarak isimlendirilir (Bouwstra ve Gooris 2010). Bu durumda, 2008 yılına kadar insan SC'unda seramitler için 11 alt sınıf tanımlanmıştır (Masukawa ve ark. 2008). Ayrıca, 2011 yılında, van Smeden ve ark. """""""" yaptıkları çalışmada ω- hidroksi yağ asiti ile dihidroksisfingozinden oluşan seramit EOD'yi tanınlamışlardır (van Smeden ve ark. 2011).

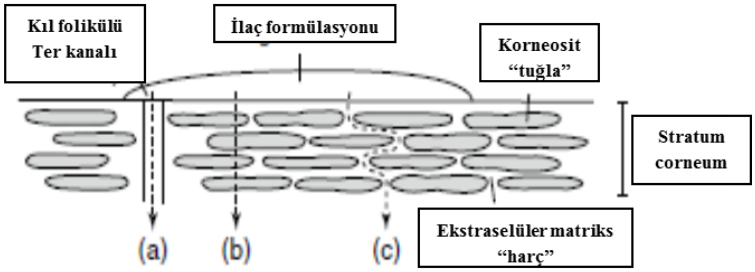
Epidermisin farklılaşma sürecinde; keratinositler bazal tabakadan başlayarak üstteki tabakalara doğru göç ederken, şekil ve içerik bakımından değişimine uğrarlar ve bir çok yapısal protein ile lipit sentezler. *Deskumasyon* adı verilen bu süreçte yeni hücrenin *stratum corneum*'a ulaşması 14 ve bu hücrenin *stratum corneum*'dan dökülmesi 14 gün sürer (Williams 2003 p.9; Benson 2012 p.4).

2.1.1. Deriden Geçiş Yolları

İlaç moleküllerinin deriden geçişi için en önemli tabaka *epidermis,* özellikle bu tabakanın en üstteki SC tabakasıdır. Derinin bariyer özelliğinin yapısı ve fonksiyonu ile ilgili pek çok model vardır. 1975 yılında Michaels ve arkadaşları tarafından *tuğla ve harç* (*brick and morter)* modeli tanımlanmıştır (Michaels ve ark. 1975). Bu modelde; korneositlerin duvarın tuğlalarını oluşturduğu, seramitlerin, yağ asitlerinin, kolesterolün, kolesterol esterlerinin de duvarın harç yapısını oluşturduğu düşünülür (Williams 2003 p. 9; Benson 2012 p.7).

İlaç molekülleri deriden geçerken üç farklı yol izlediği öngörülmektedir:

- Hücreler arası yol (İnterselüler, Paraselüler)
- Hücre içi yol (Transselüler, İntraselüler yol)
- Yan geçit yolları (Transappendal, Transfoliküler, Shunt yollar: Ter bezleri, Yağ bezleri, Kıl folükülleri) (Williams 2003 pp. 30-35; Roberts ve ark. 2007 pp.94-100; Benson 2012 pp. 14-16).



Şekil 2-3: Deriden geçiş yolları: a) Yan geçit yolu b) Hücre içi yol c) Hücrelerarası yol (Ng ve Lau 2015 p.9)

Deriden geçiş, aktif ve pasif geçiş olmak üzere ikiye ayrılır.

Pasif düfüzyona dayalı deriden geçiş için ilacın orta derece lipofilik olması (log P 1-3) ve molekül ağırlığının 500 Dalton'un altında olması gerekir (Williams 2003 pp. 35-38; Brown ve ark. 2006; Korting ve Schäfer-Korting 2010). Aynı zamanda düşük erime noktasına sahip olması, suda ve yağda yeterli çözünürlükte olması da gerekir (Korting ve Schäfer-Korting 2010).

Hücreler arası yol, SC'da küçük bir yüzey alanına sahip, sürekliliğini koruyan kıvrımlı ana geçiş yoludur. SC lipitleri derinin bariyer özelliğine katkı sağlar. Dolayısıyla, moleküllerin hücreler arası lipit alanından geçebilmesi için hem lipofilik özellik (lipit zincirden difüzyon) hem de polar özellik (polar baş gruplarından difüzyon) gerekir. Aşırı polar yapıdaki moleküller için difüzyondaki hız sınırlayıcı bölge SC'da polar yoldur ki bu da moleküllerin yağ/su partisyon katsayısından bağımsızdır. Daha az polar yapılı moleküller ise lipit yoldan difüze olur ve permeasyonları lipofilite artıkça artar (Benson 2012 p.16).

Hücre içi yol SC'da polar yol olarak yer alır. Korneositlerin içindeki keratin matriks polar bir alan oluştururken, hücrelerin çevresini saran lipit yapı lipofilik alan meydana getirir. Dolayısıyla molekül permeasyonu için polar ve lipofilik çevreler arasında tekrarlı bir şekilde partisyon ile karşılaşır (Benson 2012 pp 15-16).

Yan geçit yolağını oluşturan bileşenler deri yüzey alanının %0,1-1'ini kapsar. Su ile dolu ter bezlerinin ve lipit özellikte sebum taşıyan foliküler bezlerin varlığına rağmen yan geçit yollarının deriden geçişte düşük dirençli olduğu kabul edilir. (Benson 2012 pp 14-15).

İlaçların deriden geçişini etkileyen faktörler Tablo 2-1'de özetlenmiştir.

Tablo 2-1: : Deriden geçişi etkileyen faktörler (Williams 2003 pp. 14-23; Değim 2007 pp. 344-346)

Biyolojik faktörler	**Derinin fizyolojik durumu**	**Etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri**	**Formülasyona ait faktörler ve deriden geçişi artırıcı yaklaşımlar**	**Diğerleri**
Yaş	Hidratasyon	Lipofilite	Etkin maddenin taşıyıcaya ilgisi	Sıcaklık
Irk		Hidrojen bağı yapma yeteneği	Penetrasyon artırıcıların	Oklüzyon
Derinin ait olduğu vücut bölgesi	Patalojik bozukluk	Molekül ağırlığı		İlacın konsantrasyonu
Cinsiyet		Elektirksel yükü ve duyarlılığı		
Diyet		Oktanol/su partisyon katsayısı (logP)		
		pH		

İlaçların deriden aktif yöntemle geçişi ise çeşitli mekanik ve fiziksel yöntemlerle gerçekleşir. Böylece lipofilik özelliği farklı ve molekül ağırlığı yüksek olan moleküllerin geçişi sağlanabilir. (Brown ve ark. 2006).

Deriden geçişis artırılmasında kullanılan yöntemler Tablo 2-2'de kısaca gösterilmektedir [(*) Williams 2003 pp. 86-102; (**) Brown ve ark. 2006; (***) Değim 2007 pp.349-350; (****) Leite-Silva ve ark. 2012 ve Güngör 2014 pp. 336-340].

Tablo 2-2: Deriden geçişin artırılmasında kullanılan yöntemler

Kimyasal penetrasyon artırıcılar (*)	**Mekanik yöntemler (**)**	**Elektriksel metodlar (**)**	**Diğer yöntemler (**)**	**Fizikokimyasal yöntemler (***)**	**Yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler (****)**
Sülfoksitler ve benzer kimyasallar *(Dimetilsülfoksit, Dimetilasetamit, Dimetilformamit)*	Mikroiğne bazlı sistemler *(Makroflux®, E-Trans®)*	İyontoforez	Ultrasound *(Sonoforez ve Fonoforez)*	İyonik özellikler	Veziküller nanotaşıyıcılar *(Lipozom,etozom, transferzom,niozom)* *SECosome: Sürfakta-etanol-kolesteroldan oluşan nanozom*
Terpenler *(Limonen,Menton,Mentol)*	Deri abrasyonu	Eletrodelme (Elektroporasyon)	Lazer radyasyon	Aşırıdoygunluk	Nanoemülsiyonlar ve Mikroemülsiyonlar
Pirolidonlar ve türevleri Azon	Deri ponkisyonu ve perforasyon,		Fotomekanik dalgalar	Enantiyo seçicilik	Miseller
Yağ asitleri *(oleik asit, laurik asit, linoleik ve linolenik asit)*	Deriyi esnetme		*Magnetophoresis*		Kuantum noktaları, fulleren, karbon tüpleri,
Alkoller (*etanol),* Yağ alkolleri *(miristil alkol)* Glikoller *(propilen glikol)*	Deri ablasyonu		*Thermophoresis*		Dendrimerler,
Sürfaktanlar Anyonik *(sodyum lauril sülfat)* Katyonik *(Setiltrimetil amonyum bromit)* Non-iyonik *(Tween 80, Tween 20)*	İğnesiz enjeksiyon *(Powderject®,Ped-O-Jet®, Iject®, Biojector2000®)*		Radyofrekans		Katı lipit nanopartiküller *(SLN:Solid lipid nanoparticle),* Nanoyapılı lipit taşıcılar *(NLC:Nanostructured lipid carrier)*
Üre *(hidrate edici)*					Mikro ve nano küreler

2.2. Atopik Dermatit Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler

Atopik dermatit (AD) insan derisinin epidermis bariyerini destekleyen proteinlerin genetik bozukluğuna bağlı gelişen, kaşıntılı, enflamasyonlu kronik bir deri hastalığıdır (Plötz ve Ring 2010). *Atopos* kelimesinin kökeni, İngilizce yabancı (*strange*) veya alışılmadık (*unusual*) kelimelerine dayanmaktadır (Alper ve Türk Gerçeker 2011). Derinin enflamasyonu anlamını taşıyan "dermatit" terimi de hastalığın olgusunun tanımlamak için kullanılmaktadır (Moreno Gimenez 2000). AD, "atopik egzema", "alerjik dermatit", "prurigo besnier", "endojen dermatit" ve "nörodermitit" olarak da bilinir. AD hastalığının isimlendirilmesindeki farklılık, patofizyolojisinin değişik görüşlerle açıklanmasından kaynaklanır (Plötz ve Ring 2010).

AD lezyonlarının gelişimi için iki hipotez ortaya atılmıştır. Birinci hipotez (*inside-outside hypothesis*); hastalıkta görülen enflamatuvar yanıtın derinin bariyer özelliğindeki bozukluklara karşı geliştiğini vurgular. İkinci hipotez (*outside-inside hypothesis*) ise, derinin kuruluğu ve bariyer özelliğindeki bozuklukların enflamasyona neden olduğunu savunur (Van Bever ve Llanora, 2011).

Ayrıca, AD'de enflamasyonun önce epidermisin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin değiştiren kalıtsal ve kazanılmış hasarlardan, ardından da deri bariyeri homeostazı için olumsuz sonuçlara yol açan bağışıklık sisteminin aktivasyonundan kaynaklandığına dair yeni kanıtlar da ortaya atılmıştır. Bu görüşte AD patojenezinin bir "dış-iç-dış" (*outside-inside-outside)* döngüsü içinde yer aldığı ifade edilmiştir (Elias ve Steinhoff 2008).

AD yaygınlığının gelişmiş ülkelerde yaşayan çocuklarda yaklaşık %15-30 ya da %20; erişkinlerde ise %2-10 ya da %1-3 olduğu bildirilmektedir (Bieber 2010; Ring ve ark. 2012). Kentsel bölgelerde yaşayan çocuklarda AD görülme sıklığının kırsal alanlarda yaşayanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiş ve bu durum hijyen hipotezi ile açıklanmıştır (Strachan 1989; Zutavern ve ark. 2005).

AD genetik ve çevresel faktörlerin birbiri ile etkileşimi sonucu gelişen karmaşık bir hastalık olarak tanımlanır (Bieber 2007). Genetik çalışmalarda AD ile ilişkili kromozomlar tanımlanmış (Haagerup ve ark. 2004), aynı zamanda gen mutasyonunun AD ile ilgisi gösterilmiştir (Kato ve ark. 2003; Leung ve ark. 2004).

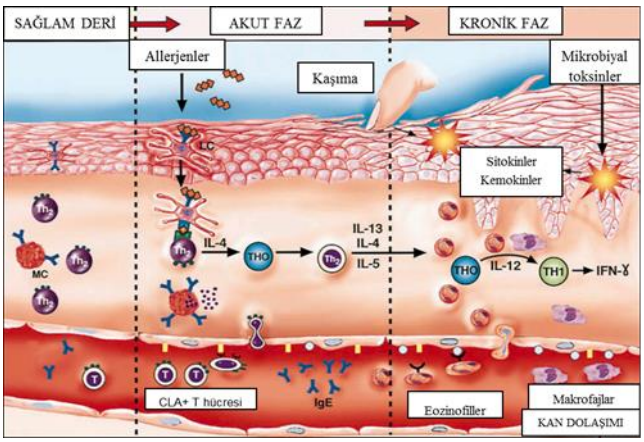
Örneğin epidermanın bariyer proteininin kodlandığı *filaggrin* (FLG) geni epidermal farklılaşma kompleksi (1q21) üzerinde bulunur. Bu gende mutasyon gelişmesi sonucunda şiddetli ve düzelme eğiliminde olmayan AD tablosu geliştiği öne sürülmektedir (Barker ve ark. 2007; Morar ve ark. 2007).

AD hastalığının gelişimini ve ciddiyetini çevresel faktörler de etkilemektedir (Plötz ve Ring 2010). Örnek olarak inek sütü, yumurta ve alkol gibi bazı içecek ve yiyeceklerin tüketimi (Ring ve ark. 2012), su, sabun ve deterjanların daha sık kullanımı, ev tozu akarları, evcil hayvanlar ve polenler ile maruziyet, ayrıca patojen veya süperantijen etki oluşturabilen *Staphylococcus aureus* gösterilebilir (Beltrani ve Boguneiwicz 2003).

2.2.1. AD Patogenezi

AD'nin patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, hastalığın ortaya çıkmasında immunoglobulin (*Ig*) *E* ile oluşan tip I reaksiyonların ve *T* hücreleri ile oluşan tip IV reaksiyonların rol oynadığı belirtilmektedir (Lugovic ve ark. 2001). *T* hücrelerinin ürettiği sitokin tiplerine göre farklı *T* hücreleri (*Th0 Th1 Th2 Th3*) tanımlanmıştır (Eales 2003 p.1-28). Bu hücrelerden *Th1* ve *Th2* nin baskınlığı, hastalığın akut ve kronik lezyonlu olma durumuna göre değişmektedir (Leung ve ark. 2004). Aynı zamanda, hastalığının gelişiminde *Langerhans* hücreleri ve *dendritik* hücreler ile birlikte monosit, makrofaj, eozinofil, mast hücreleri, lenfositler, bazofiller, keratinositler de rol oynar (Bieber 2010).

Atopik dermatit hastalığına bağlı olarak deride gelişen immunopatolojik değişikliklerin şeması Şekil 2-4'de verilmiştir.



Şekil 2-4: AD gelişiminde immünolojik süreç (Leung ve ark. 2004)

Alerjen maddeler veya otoalerjenler *dendritik* hücreler yolu ile *Th2* aktivitesini artırırak atopik duyarlaşmaya neden olur (Shreffler ve ark 2006). Bu kapsamda keratinositlerden *TSLP* (*Timik stromal lenfopoietin*) salgılanarak *T* hücrelerinin *Th2* yönündeki farklılaşmasına yardımcı olur. *Th2* hücrelerinden IL-4, IL-5, IL-13 ve TNF-α sitokinleri salgılanır ve akut faz meydana gelir (Bieber 2010). Kronik faz, eozinofillerin, makrofajların ve *dendritik* hücrelerin enflamasyonu ve infiltrasyonu ile sonuçlanır. Söz konusu hücrelerde üretilen IL-12 *Th2* ağırlıklı akut enflamasyonun *Th1* ağırlıklı kronik enflamasyona dönüşmesine yol açarak IFN-γ (İnterferon gama) düzeyinde artışa neden olur (Leung ve ark. 2004). Bütün bu reaksiyonlar, kronik enflamasyonun derideki *T* hücrelerinin artışı ile meydana geldiğini ve karmaşık bir mediatör ağı tarafından yönetildiğini göstermektedir (Homey ve ark. 2006).

2.2.2. Atopik Dermatit Hastalığında Derinin Durumu

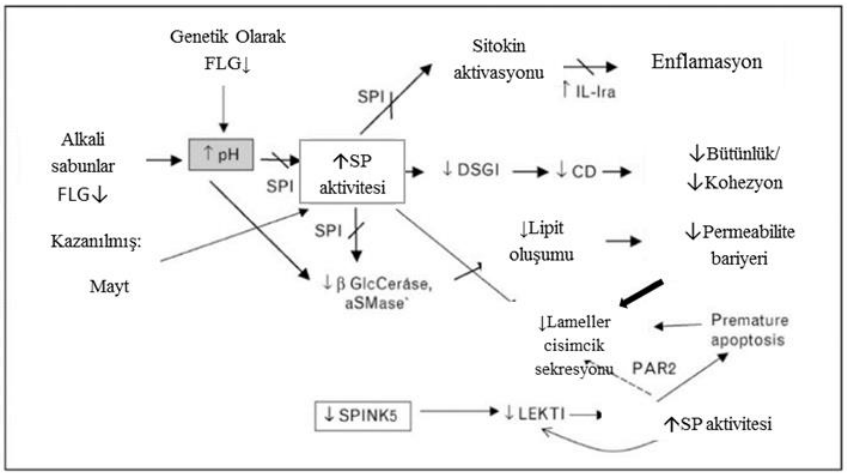
AD, immünolojik değişimlerin eşlik ettiği, deri bariyer özelliğinde meydana gelen bozulmalar sonucu gelişen enflamasyon, kuruluk ve bakteriyel enfeksiyon ile karakterize bir hastalıktır (Simpson ve ark. 2013).

*Deskuamasyon'*u düzenleyen *proteaz*lar ve *proteaz* inhibitörleri arasındaki dengenin bozulması, SC enzimlerini ve proteazların aşırı ekspresyonu (Van Bever ve Llanora 2011), seramit düzeylerinin azalması (Krakowski 2008) ve *filagrin* enziminde değişikliklerin (mutasyon, polimorfizm, ekspresyon düşüklüğü vb.) meydana gelmesi AD'li deride görülen anomalilikler arasındadır (Ginger ve ark. 2005; Marenholz ve ark. 2006; Krakowski 2008; Van Bever ve Llanora 2011).

AD hastalığında, SPINK 5 geninde oluşan mutasyon sonucu bir serin proteaz inhibitörü olan LEKTI 1 *(Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor*) kodlanamaz ve aşırı serin proteaz (SP) aktivasyonu gerçekleşir. SP aktivasyonu sonucunda *korneodesmozom*ları birbirine bağlayan yapısal protein olan desmoglein 1 parçalanır. (Jensen-Michael ve ark 2006 pp. 570-571). Diğer enflmasyonlu deri hastalıklarında olduğu gibi AD'de de derinin pH değeri artar. Bu durum da serin proteazların aktivitesinin artmasına yol açarak *stratum corneum* bütünlüğünün bozulmasına katkı sağlar (Jensen-Michael J. ve ark. 2006 p.572).

Serin proteaz ailesi üyeleri olan ve *deskuamasyon*da anahtar rol oynayan SCCE *(stratum corneum kimotriptik enzim)* ve SCTE *(stratum corneum triptik enzim)*

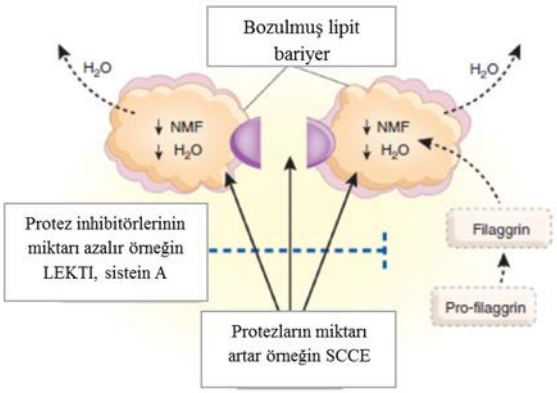
peptidazları ise SP aktivasyonu sonucu *stratum granulosum-stratum corneum* ara yüzeyine salınarak lameller cisimleri parçalar (Cork ve ark. 2009). Dolayısıyla, derinin yapısında bozulma ve *stratum corneum* tabakasında incelme meydana gelir (Jensen-Michael J. ve ark 2006 pp. 570-572; Cork ve ark. 2009).



Şekil 2-5: Aktif serin proteazların *stratum corneum* fonksiyonlarını etkileyen mekanizmaları (Elias ve Schmuth 2009).

DSG, desmoglein; FLG, filaggrin; LEKTI, lymphoepithelial Kazal-tip tripsi inhibitorü; PAR2, plasminojen aftivatör reseptörü tip 2; SPI, serin proteaz inhibitörü

Epidermisin bariyer fonksiyonunun bozulma sebeplerinden biri de *filaggrin* geninde meydana gelen mutasyondur. Epidermal farklılaşma sürecinde *filaggrin* makro fibrillerin agregasyonuna yardımcı olarak, hücre iskeletinin bozulmasına yol açar ve keratinositlerin yassılaşmasına neden olur. Daha sonra bozulan ve sıkışan keratinler transglutaminaz enzimiyle çapraz bağlanarak kornifiye zarfın iskeletini oluşturan keratin matriksi meydana getirir. Bu süreçte *filaggrin*, kaspaz 14 ile histidine dönüşür. Histidin ise, urokanik asit (UCA) ve prolidin-5-karboksilik asiti (PCA) içeren ve NMF'yi (Natural moisturizing factor, doğal nemlendirici faktör) oluşturan hidrofilik amino asitlere dönüşür. UCA ve PCA hem SC'nin hidrasyonuna hem de suyun osmotik olarak keratinositlere çekilmesine yardımcı olurlar. Bununla birlikte derinin asit yüzeyinin devamlılığını sağladıkları da düşünülmektedir. Sonuç olarak, *filaggrin* genindeki mutasyon sonucu hem SC bütünlüğü bozulur hem de derinin su tutma kapasitesi azalır (Sandilands ve ark. 2009). Bu kapsamda, deri üzerinden gerçekleşen su kaybının (Transepidermal su kaybı, TEWL) 2-5 kat arttığı belirtilmiştir (Jensen-Michael J. ve ark 2006 p.571).



Şekil 2-6: : Bozulmuş epidermal bariyer alerjenlerin girişine izin verir ve nem kaybına neden olur (Cork ve ark 2009).

LEKTI, lymphoepithelial Kazal-tip tripsi inhibitorü; NMF, doğal nemlendirici faktör; SCCE, *stratum corneum* kimotriptik enzimi

AD hastalığında yüksek oranda SC lipitlerinde yani kolesterol, serbest yağ asitleri ve özellikle seramitlerde (CER) azalma meydana gelir (Jensen-Michael J. ve ark 2006 p. 573). Yapılan çalışmalarda AD'li deride gözlenen bozukluklar seramitlerin miktarında meydana gelen azalmalar ile ilişkilendirilmiştir (Yamamoto ve ark. 1991; Matsumoto ve ark. 1998; Proksch ve ark. 2003; Vavrova ve ark. 2004; Janssens ve ark. 2011). Seramitlerin AD'deki yetersizliklerinin nedeni kesin olarak aydınlatılamamıştır (Jensen-Michael J. ve ark 2006 pp. 573). Seramitlerin yapımında görev alan enzimlerdeki değişiklikler de SC'daki seramitlerin düzeyini etkilemektedir (Jensen-Michael J. ve ark 2006 pp. 573-575).

AD'li hastalarda normal sağlıklı deriye sahip bireylere göre, *deskumasyon* sürecinde epidermisten daha fazla korneosit salınır. Dolayısıyla SC tabakası incelir ve korneosit alanı küçülür. Bu değişiklerin nedeni, farklılaşma proteinlerinin (*keratinler, lorikrin involukrin ve filaggrin*) ekspresyonunda meydana gelen değişimlere bağlanır (Jensen-Michael J. ve ark 2006 pp. 576-577).

Antimikrobiyal peptitler (AMP), deri üzerinde bulunan ve doğal bağışıklıkta önemli rol oynayan katyonik küçük polipeptitlerdir. Çoğunlukla derideki keratinositlerden üretilen *β- defensinler* ve *katelisidinler* bakteri, mantar ve viral patojenlere karşı etkili olan iki önemli sınıfı oluşturur. AD'de bozulan epidermisin bariyer kaynaklı *β-defensin* 1 (HBD-1) ve *β-defensin* 2 (HBD-2) ile *katelisidin* (LL-37) ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır (Ong ve ark. 2002).

Ekrin ter bezlerinin salgıladığı ter, derinin bakteri florasını sağlayarak doğuştan gelen bağışıklıkta önemli rol oynamaktadır. AD hastalığında ter içeriğinin değiştiği kaydedilmiştir. *Dermisidin* ve LL-37 azalan AMP'ler olarak saptanmıştır (Schröder ve Harder 2006). Terin içeriğinde yer alan potasyum, sodyum, üre ve laktatın NMF kaynaklı ve serbest yağ asitleri (FAAs) ile prolidon karboksilik asitin (PCA) ise *filaggrin* kaynaklı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Sugawara ve ark. 2012).

Staphylococcus aureus (*S. Aureus)* sağlıklı insanların deri, aksilla, perine ve burunlarında yaygın olarak bulunan bir bakteridir (Güneş ve Çetin 2012). Bu mikroorganizmanın sağlıklı kişilerde taşıyıcılığının %5 oranında olduğu belirtilmiştir. AD'li hastaların derisinde ise %90'ının üzerinde olduğu saptanmıştır (Leung 2000). İkincil deri enfeksiyonlarından çoğunlukla *Staphylococcus aureus* bakterisinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Walling ve Swick 2010).

2.3. Atopik Dermatit Hastalığının Tedavisi Hakkında Genel Bilgiler

Etkili bir AD tedavisi kısa dönemdeki alevlenmeleri kontrol altına alacak, uzun dönemde ise alevlenmeleri minimalize ederek ve deri bakımı oluşturarak derinin devamlılığını sağlayacak şekilde planlanması önerilmektedir (Simpson 2010). Bunun için öncelikle tetikleyici çevresel alerjenlerin belirlenmesi ve bunlardan kaçınılması önerilir. Stresle başa çıkabilmek için psikolojik desteğinde tedaviye eklenebileceği de belirtilir (Plötz ve Ring 2010). Gerek akut AD gerekse kronik AD vakalarında topikal tedavi uygulandığı, ancak hastalığın çok şiddetli olduğu durumlarda fototerapi veya sistemik uygulanabileceği bildirilmiştir (Walling ve Swick 2010).

2.3.1. Topikal Tedavi

Topikal uygulama derideki patolojik bölgelerin hedef alındığı ve minimum sistemik absorpsiyonun sağlandığı bir tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (Brown ve ark. 2006 ; Colin Long 2007 p.41). Topikal uygulama tedavi uyuncunun yüksek olduğu, girişimsel olmayan, kolay ve acısız bir ilaç uygulama şeklidir (Joshi ve ark. 2014). AD'te topikal tedavi kaşıntı ve enflamasyonun, ayrıca sekonder olarak gelişen deri enfeksiyonlarının giderilmesinden meydana gelir (Akdiş ve ark. 2006).

2.3.1.1. Derinin Nemlendirilmesi

AD'de deri oldukça kurudur ve bundan dolayı gelişen kaşıntı hastalığın patogenezidir. Bu nedenle, öncelikle derinin nemlendirilmesi tedavide anahtar rol oynar (Grilmalt ve ark. 2007; Eberlein ve ark. 2008).

2.3.1.2. Topikal Kortikosteroitler

Topikal kortikosteroidler antienflamatuvar tedavinin birinci basamağını oluşturmaktadır. Alevlenme dönemlerini kontrol altına almak için kısa süreli (5-7 gün) kullanımları önerilmektedir. Steroit korkusu "*Corticophobia*" hastalığın tedavisinde tedavi etkinliğini azaltan ana problemdir. Topikal glukokortikosteroitlerin uzun süreli kullanımlarında deri atrofisinin görüldüğü ve taşiflaksi geliştiği kaydedilmiştir (Fardet ve ark. 2007). Bu nedenle derinin ince olduğu bölgelerde (periorbital ve genital) ve çocuklarda dikkatli kullanılmaları önerilmektedir (Plötz ve Ring 2010).

Glukokortikoitler enflamatuvar yanıtta görev alan sitokinlerin ekspresyonunu değiştirerek etki ederler. Bu ilaçlar vazokonstrüktör (damar büzücü) etkilerine göre I (en güçlü) ve VII (en zayıf) olmak üzere 7 sınıfa ayrılır. Sınıf VII ve VI için hidrokortizon, desonid, orta potens etkili sınıf III-V için triamsinolon, mometason, flutikazon, yüksek potens etkili sınıf I-II için fluosinoid, deksametazon, betametazon dipropionat, klobetasol, halobetasol örnek verilebilir (Walling ve Swick 2010).

Topikal kortikosteroit kullanımına enflamasyon azaldığında ara verilmesi ancak derinin nemlendirmesine devam edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Charman ve Williams 2003).

2.3.1.3. Topikal Kalsinörin İnhibitörleri

Pimekrolimus ve takrolimus topikal AD tedavisinde FDA onaylı kalsinörin inhibitörleridir. Bu ilaçlar kalsiyum bağımlı serin/treonin fosfataz "kalsinörin" inhibisyonu yaparak *T* hücrelerinin aktivasyonunu inhibe eder (Plötz ve Ring 2010). Kalsinörin inhibitörlerinin AD tedavisinde ikinci basamak terapide topikal kortikosteroit tedavisine yanıt vermeyen veya topikal kortikosteroitlerin uygun olmadığı hastalarda kullanımları önerilmektedir (Simpson 2010).

10 Mart 2005 tarihinde, FDA, Halk Sağlığı Danışma Kurumu bu ilaçların kullanımıyla ilgili güvenlik endişelerini açıklamıştır (FDA Pediatrik Danışma Kurulu, 2005). Ancak, Bieber ve ark. etkin maddelerin maliniteyi artırdığına dair klinik çalışma

olmadığını ifade etmiştir (Bieber ve ark. 2005). Bu kapsamda ilaçların 2 yaşından büyük çocuklarda kullanılabilecekleri belirtilmiştir (Ring ve ark. 2008).

%0,03 Protopic® merhemin 2 yaş ve üstü hastalarda ve %0,1 Protopic® merhemin 15 yaş üstü hastalarda kısa süreli olarak ikinci basamak tedavide; %0,1 Protopic® merhemin orta-şiddetli AD'de 2 yaş ve üstü hastalarda aralıklı olarak uzun süreli kullanılabileceği bildirilmiştir (Protopic® (Tacrolimus) merhem ABD Reçete Bilgileri 2000 ve 2011).

Pimekrolimus kremin (Elidel® %1) kullanımı hafif-orta AD tedavisinde 2 yaş ve üstü şeklinde bildirilmiştir (Elidel® (Pimecrolimus) krem ABD Reçete Bilgileri 2001 ve 2010).

Topikal kalsinörin inhibitörlerinin reseptör afinitelerinin yüksek ve deri absorpsiyonlarının daha düşük olduğu belirtilmiştir. Bu nedenle topikal kortikositeroitlerin uzun süreli kullanımlarına bağlı gelişen *(telenjiektazi, stria, deri atrofisi ve dispigmentasyon, anaflaksi ile kontakt alerji)* ve aşırı kullanımlarına bağlı oluşan *(hipofiz bezinini baskılanmasıyla tetiklenen Cushing sendromu)* yan etkilere neden olmadıkları bildirilmiştir (Gutfreund ve ark. 2013). Kalsinörin inhibitörlerinin endotel hücrelere ve fibroblastlara etki etmedikleri için atrofojenik aktivitesinin olmadığı, pimekrolimusun *T* lenfositleri ve mast hücrelerini; takrolimusun *T* lenfositleri ve mast hücreleri, eozinofilleri, bazofilleri ve en önemlisi *Langerhans* hücrelerini etkilediği belirtilmiştir (Nghiem ve ark. 2002).

2.3.1.4. Antibakteriyel ve Antimikotik Tedavisi

AD'li hastaların bakteriyel, fungal, viral deri enfeksiyonlarına yatkın oldukları ve bakteriyel süper enfeksiyonların kızarıklık ve kabuklanma ile karakterize deri lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Topikal antiseptikler triklosan, klorheksidin, kristal viyole ve antibiyotik deri kremleri (fusidik asit) akut alevlenmeleri ve bakteriyel impetiginizasyonu tedavi etmek için reçete edilen ilaçlardır (Plötz ve Ring 2010).

Fusidik asitin minimum inhibisyon konsantrasyonun düşük olması ve doku penetrasyonunu iyi olması sayesinde topikal uygulamada derideki *S. Aureus* enfeksiyonlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Akdiş ve ark. 2006). Aynı zamanda topikal antibiyotiklerin devamlı kullanımında direnç gelişebileceği de bildirilmiş olup

stafilokok enfeksiyonlarının klinik tabloya eklendiği durumlarda kısa süreyle uygulanmaları önerilmiştir (Darsow ve ark. 2010).

AD tedavisinde topikal korkositeroitler, topikal kalsinörin inhibitörleri ve UV ile sağlanan antienflamatuvar etkinin ayrıca sitafilokok kolonizasyonunu azalttığı da kaydedilmiştir. Bu durum *S. Aureus* kolonizasyonunun daha yüksek olduğu AD'li hastalarda kortikosteroitler ile antibakteriyel ilaçların birlikte kullanımına yol açmıştır (Darsow ve ark. 2010).

Fusidik asitin topikal dozaj şekillerinde kullanılan hidrokortizon asetat, betametazon valerat ve mometazon furoat ile kombine halde preparatı mevcuttur (RX Media Pharma Erişim tarihi: 29.01.2017) ancak kalsinörin inhibitörleriyle ile kombine ticari bir preparatı mevcut değildir.

2.3.2. Fototerapi

Fototerapinin inatçı AD tedavisinde etkili olduğu ve ultraviyole ışın (UV) tedavisinin UVA-1, UVB veya her ikisinin kombinasyonu şeklinde uygulandığı bildirilmiştir (Krutmann 2000). UVA-1'in enflamatuvar hücrelerde apopitoz meydana getirdiği, *Langerhans* hücreleri ve *dendritik* hücrelerin sayılarında azalma sağladığı gösterilmiştir (Legat ve Wolf 2009). UV tedavisinin 12 yaş altındaki çocuklarda uygulanmaması gerektiği bildirilmiştir (Akdiş ve ark. 2006).

2.3.3. Sistemik Tedavi

Sistematik tedavilerin, hastalığı ileri seviyede olan hastalarda akut atakları engellemek ve uzun dönemde hastalığı baskılayabilmek için kullanıldığı bildirilmiştir (Kutlubay ve ark. 2012). Kortikosterotlerin (prednison ve metilprednisolon), siklosporin, metotreksat, azatiyopürin mikofenolat mofetil gibi ilaçların sistemik tedavide uygulanabileceği belirtilmiştir (Walling ve Swick 2010).

2.4. Takrolimus Hakkında Genel Bilgiler

Takrolimus ilk kez 1984 yılında *Streptomyces tsukubaensis* isimli bir toprak bakterisi tarafından Japonya'nın *Tsukuba* bölgesinde üretilmiştir. İlk olarak FK-506 olarak tanınmış olup isim kökeni *Tsukuba* (toprak örneğinin geldiği dağ) ve *macrolide* (makrolit yani çok sayıda fonksiyonel grubun bağlandığı büyük halkalı molekül) ve ayrıca immüsüpresif olmasına dayanır (Ruzicka ve ark. 1999; Gupta ve ark. 2002). Takrolimusun ilk olarak 1989 yılında karaciğer nakli yapılan bir hastada kullanıldığı

kayıtlıdır (Thomson 1990). İlacın organ (böbrek, karaciğer ve kalp) nakli yapılan hastalarda dokunun reddini önlemek için kullanıldığı bildirilmiştir (Ruzicka ve ark. 1999; Cather ve ark. 2001). Ayrıca, sistemik ve topikal takrolimusun enflamatuar deri hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceği de gösterilmiştir (Ruzicka ve ark. 1999). Örneğin atopik dermatit, kontakt dermatit ve *psöriasis,* steroidin indüklediği *rozase, ichthyosis linearis circumflexa*, piyoderma gangrenozum, bacak ülseri, liken *planus,* saç uzaması (*alopecia areata*) gibi hastalıklarda topikal; Behçet hastalığı, inatçı piyoderma gangrenozum ve inatçı *psöriasis* vakalarında sistemik uygulandığı belirtilmiştir (Gupta ve ark. 2002).

Takrolimusun etki mekanizması şu ekilde açıklanmaktadır: takrolimus, takrolimus bağlayıcı proteine (macrophilin-12, FK506-binding) bağlanır. Takrolimus ve bağlayıcı proteinin oluşturduğu kompleks, kalsinörin inhibisyonuna neden olur. Kalsinörin, sitokinlerin transkripsiyonel aktivasyonunda temel rol oynayan bir enzimdir. Baskılanması sonucu başta interlökin- 2 (*IL-2*) olmak üzere *IL-4, IL-5* ve ayrıca tümör nekroz faktörü-α (*TNF-α*) ile interferon-γ (*INF-γ*) gibi inflamatuar sitokinlerin salımı inhibe olur (Gutfreund ve ark. 2013).

Takrolimusun *IL-2* sentezini azaltma gücünün siklosporinden 10 ile 100 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Cather ve ark. 2001). Takrolimusun topikal uygulama sonrası emiliminin derinin fiziksel durumuna bağlı olduğu gösterilmiştir. Örneğin hasarlı dokudan emiliminin sağlam dokuya göre 7 kat fazla olduğu saptanmıştır (Kawashima ve ark. 1996).

2.4.1. Takrolimusun Yapısı ve Özellikleri

Kimyasal formülü: 17-allil-1,14-dihidroksi-12-[2-(4-hidroksi-3-metiloksisiklohegsil]-1-metilvinil]-23,25-dimetoksi-13,19,21,27-tetrametil-1-11,28-dioksa-4-azatrisiklo- [22.3.1.$0^{4.9}$]octacos-18-en-2,3,10,16-tetron monohidrat

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

Molekül ağırlığı: 822,03 g/mol

Erime noktası: 123-130 °C

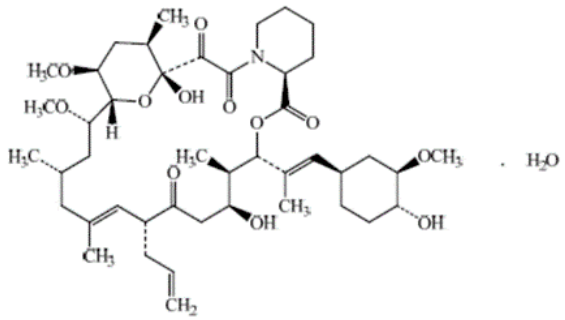
Log P: 4,5 (yaklaşık)

Terapotik kategori: İmmünosupresan

Görünüm: Beyaz toz

Çözünürlük: Aseton, kloroform ve etil oleat içinde çözünür; suda çözünmez

İzomerleri: Tautomeri mevcuttur.



Şekil 2-7: Takrolimus'un kimyasal yapısı

Takrolimusun organik safsızlıkları: Takrolimus 8-propil analog, Askomisin, Takrolimus 8-epimer, Askomisin 19-epimer ve Desmetil takrolimus (Takrolimus, İlaç Ana Dosyası 2014).

2.4.2. Takrolimus İçeren Müstahzarlar

Takrolimus içeren Türkiye pazarında bulunan topikal müztahzarlar Tablo 2-3'te gösterilmektedir.

Tablo 2-3: Türkiye pazarında bulunan takrolimus içeren müstahzarlar (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017)

Müstahzar Adı	Etki/Yitililik	Dozaj Formu	Firma Adı
Protopic	%0,03	Merhem/Topikal	Leo Pharma İlaç
Protopic	%0,1	Merhem/Topikal	Leo Pharma İlaç
Tacrolin	%0,03	Merhem/Topikal	Farma Tek
Tacrolin	%0,1	Merhem/Topikal	Farma Tek

2.4.3. Takrolimus İçeren Yenilikçi İlaç Taşıyıcı Sistemler

Stratum corneum, moleküllerin deriden penetrasyonunda etkin bir bariyer olduğundan sınırlı sayıda moleküllerin pasif difüzyonuna imkan sağlar. Bu durumun üstesinden gelebilmek için yenilikçi mikro ve nano bazlı taşıyıcı sistemler

geliştirilmektedir (Leite-Silva ve ark. 2012). Atopik dermatit, seboreik dermatit ve kontakt dermatiti gibi dermatit hastalıklarının tedavisi için mevcut olan konvansiyonel dozaj fomlarına alternatif olarak dermal penetrasyonun iyileştirilmesi için lipozomlar, niozomlar, transferzomlar, etazomlar, lipit nano partiküller ve mikroemülsiyonlar gibi yenilikçi taşıyıcılar önerilmiştir (Şenyiğit ve ark. 2012).

Takrolimusun da yenilikçi taşıyıcı sistemler kullanılarak deriden penetrasyonunu artırmaya yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda takrolimus içeren merhem ile yenilikçi taşıyıcı sistemler kıyaslanmış, hedef bölgede (deride) takrolimus biyoyararlanımının söz konusu sistemlerle istatiksel olarak anlamlı ölçüde fazla olduğu bildirilmiştir. Takrolimusun dermal ve transdermal uygulamalara yönelik geliştirilen yenilikçi taşıyıcı sistemlerine ait çalışmalar Tablo 2-4'te özetlenmektedir.

Takrolimusun katı lipit nanopartikül formülasyonlarının atopik dermatit tedavisindeki etkinliği *in vivo* koşullarda çalışma yapılarak biyodağılım, etkinlik ve güvenlik incelemeleri yapılmıştır. Çalışmalarda takrolimusun biyodağılımının sadece hedeflenen bölge ile sınırlı kaldığı ve sistemik dolaşıma geçmediği saptanmıştır. Enflamasyonların baskılanması açısından geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğinin takrolimusun piyasa preparatı Protopic® merheme göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Pople ve Sing 2012; Pople ve Sing 2013).

Lee ve ark. tarafından ise takrolimus yüklü topikal hidrojel formülasyonları ve krem formülasyonları geliştirilmesine yönelik bir araştırma yapılmıştır. Formülasyonların, piyasa preparatı Protopic® merhem ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* salım, *in vitro* deri permeasyon ve retansiyon çalışmaları yürütülmüştür. Deri iritasyon testiyle formülasyonların irittasyon potansiyelleri *in vivo* olarak incelenmiştir (Lee ve ark. 2016).

Tablo 2-4: Takrolimus ile hazırlanan topikal/transdermal uygulamaya yönelik nanotaşıyıcı sistemler

Nanotaşıyıcı	**Kullanılan membran/ deri**	***In vitro* çalışma**	**Model hayvan**	***In vivo çalışma***	**Referans**
Mikroemülsiyon	Tüm kalınlıkta İnsan göğüs derisi	Penetrasyon çalışması, HET-CAM	-	-	Goebel ve ark. 2011
Etazom	Tüm kalınlıkta Erkek Wistar sıçanı	Penetrasyon çalışması,	BALB/c fare	Farmakodinamik çalışma	Li ve ark. 2012
Transferzom	Nylon 66 filtre	Salım çalışması	SD sıçan KM fare	Farmakodinamik Çalışma Permeasyon çalışması	Lei ve ark. 2013
Misel	Dermatom edilmiş insan ve domuz derisi	Permeasyon ve Penetrasyon Çalışmaları	-	-	Lapteva ve ark. 2014
Nano lipit taşıyıcı	Selüloz nitrat membran Domuz kulağı derisi	Salım çalışması Permeasyon çalışması	Albino sıçan Albino tavşan	CLSM Deri iritasyon testi	Pople ve Singh 2010
Modifiye edilmiş nano lipit taşıyıcı	Selüloz nitrat membran Domuz kulağı derisi	Salım çalışması Permeasyon çalışması	Guinea Domuzu Albino Wistar sıçan Albino tavşan	Deri penetrasyonun DPK yaklaşımla araştırılması Deride birikim ve dağılımın görüntülenmesi (GS) Deri iritasyon testi	Pople ve Singh 2011

Tüm kalınlıkta deri: Adipoz doku ayrılmış deri, HET-CAM:Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane, Tavuk yumurtası-korioallantoik membran testi), BALB/c: Ev faresinin laboratuvarda yetiştirilen suşu, SD: Sprague Dawley, KM: Kun Ming, CLSM: Confocal Laser Scanning Microscopy, Lazer taramalı mikroskop, DPK: dermatofarmakokinetik, GS: Gama sintigrafi yöntemi

2.5. Fusidik Asit Hakkında Genel Bilgiler

Fusidik asit, *Fusidium coccineum'*un fermentasyon ürünlerinden izole edilen fusidan yapılı bir antibiyotiktir. Yapısal olarak steroide benzemesine rağmen steroit aktivitisine sahip olmadığı belirtilmiştir. Fusidik asit bakteride protein sentezini ribozomlara bağlanmadan inhibe eder (Rigopoulos ve Larios 2008).

Fusidik asidin ilk oral dozaj şekli 1962 yılında ve parenteral preparatı ise 1969 yılında tedavide kullanılmaya başlandığı ayrıca Türkiye'de 1998 yılının başlarında ilaç pazarında kullanıma sunulduğu bildirilmiştir (Kocabeyoğlu ve ark. 1999).

Fusidik asit, atopik dermatit ve kontakt dermatit gibi kütanöz problemler sonucu ortaya çıkan enfeksiyonlarda (sekonder enfeksiyon) kullanılan etkin ve güvenilir bir antibiyotik olarak bildirmiştir (Long 2008).

2.5.1. Fusidik Asit'in Yapısı ve Özellikleri

Kimyasal formülü: ent-(17Z)-16α-(Asetiloksi)-3β,11β-dihidroksi-4β,8,14-trimetil-18-nor-5β,10α-cholesta-17(20), 24-dien-21-oik acit hemihidrat

Kapalı formülü: $C_{31}H_{48}O_6 .½ H_2O$

Molekül ağırlığı: 525,7 g/mol

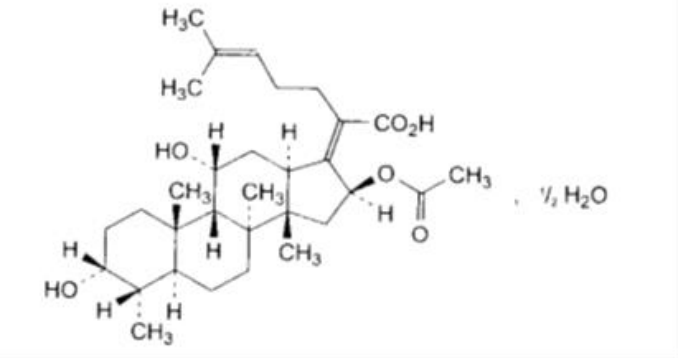
Erime noktası: 192 – 193°C

pKa: 5,35

Görünüm: Beyaz toz

Çözünürlük: Aseton, etil eter, metanol, metilen kloritte çözünür; suda çözünmez

İzomerism: İki tane steroizomeri vardır



Şekil 2-8: Fusidik asit'in kimyasal yapısı

Fusidik asit'in fermantasyon safsızlıkları: Safsızlık E, Safsızlık F, Safsızlık G, Safsızlık H, Safsızlık L ve Safsızlık M.

Fusidik asit'in bozunma safsızlıkları: Safsızlık A, Safsızlık B, Safsızlık C, Safsızlık D, Safsızlık I, Safsızlık J, Safsızlık K ve Safsızlık O (Fusidik asit, İlaç Ana Dosyası 2011).

2.5.2. Fusidik Asit İçeren Müstahzarlar

Fusidik asit veya sodyum fusidat içeren topikal müstahzarlar Tablo 2-5'te ve fusidik asit ve steroit içeren topikal müstahzarlar Tablo 2-6'da gösterilmektedir.

Tablo 2-5: Türkiye pazarında bulunan fusidik asit (*sodyum fusidat) içeren topikal müstahzarlar (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017)

Müstahzar Adı	Etki/Yitililik	Dozaj Formu	Firma Adı
Fucibest	%2	Krem	Triozer
Fucidin	%2	Krem	Abdi İbrahim
Fucidin	%2	Pomad*	Abdi İbrahim
Fucidox	%2	Krem	Dinçsa İlaç
Fucidox	%2	Pomad*	Dinçsa İlaç
Fucitec	%2	Krem	Bilim İlaç
Fucitec	%2	Pomad*	Bilim İlaç
Fusidas	%2	Krem	Berko İlaç
Stafine	%2	Pomad*	Koçak Farma
Stafine	%2	Krem	Koçak Farma
Tiremix	%2	Krem	Pharmactive

(**)Fucidin Intertulle (Abdi İbrahim) sodyum fusidat içeren gazlı bez olarak piyada mevcuttur (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017)

Tablo 2-6: Türkiye pazarında bulunan fusidik asit ve steroit topical müstahzarlar (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017)

Müstahzar Adı	Etki/Yitililik	Dozaj Formu	Firma Adı
Fucicort	% 2 Fusidik asit ve % 0,1 Betametazon valerat	Krem	Abdi İbrahim
Fucidin H	% 2 Fusidik asit ve %1 Hidrokortizon asetat	Krem	Abdi İbrahim
Fucitec Plus	% 2 Fusidik asit ve % 0,1 Betametazon valerat	Krem	Bilim İlaç
M-Furo Fa	% 2 Fusidik asit ve % 0,1 Mometazon furoat	Krem	Orva İlaç
Stafine Cort	%2 Fusidik asit ve %1 Betametazon valerat	Krem	Koçak Farma
Stafine H	%2 Fusidik asit ve %1 Hidrokortizon asetat	Krem	Koçak Farma
Tirecort	% 2 Fusidik asit ve % 0,1 Betametazon valerat	Krem	Pharmactive

2.6. Merhemler Hakkında Genel Bilgiler

En sık karşılaşılan üç yarı katı topikal formülasyon merhem, krem ve jeldir. Ekzema, sedef hastalığı ve dermatit gibi kronik dermatolojik bozukluklar için oklüzif etkisi olan merhemler veya susuz sistemler sıklıkla tercih edilir. Bununla birlikte, bu susuz karışımlar genellikle çok yapışkan ve yağlıdır ayrıca zayıf estetik özelliklere sahiptir (Brown ve ark. 2012 p.270).

Yarı katı formülasyonlar oklüzif özellikleri sayesinde özellikle emoliyentler olarak son derece yararlı olmakla birlikte, ilaçları çözündürme kapasiteleri düşük olduğu için kullanımları sınırlanır. Bu gibi durumlarda, ilaç çözünürlüğü, izopropil miristat veya propilen glikol gibi hidrokarbonlarla kolay karışabilen çözücüler yardımıyla artırılabilir. Susuz sistemler, beyaz yumuşak parafin ve petrolatum gibi klasik hidrokarbon sistemlerine ilaveten saf PEG (polietilen glikol) sistemleri veya trigliserit türevlerini de içerebilir. Alternatif olarak, silikon bazlı formülasyonlar da kullanılabilir. Ancak kapsamlı ve güvenli bir güvenlik profili olduğu açıklanması rağmen silikonların topikal formülasyonlarda kullanımı sınırlıdır (Brown ve ark. 2012 p.270).

Merhem formülasyonları farklı bazlarla hazırlanabilir (Williams 2003 pp.173-174).

- **Hidrokarbon sıvağları:** Hidrokarbon bazlı sistemler yumuşak parafin ya da yumuşak, sıvı ve katı parafin karışımlarının kullanılarak hazırlanır. Bunlar susuz özellikte olup deri yüzeyinde oklüzif tabaka oluşturarak, kuru ve pullu deride emoliyent olarak yararlı olurlar.
- **Absorpsiyon sıvağları:** Absorpsiyon bazlı sistemler emülsifiye edici yardımcı madde içerir, bu sayede su veya su bazlı karışımlarla ıslanabilen uyumlu formülasyonlar oluşur. Bunlar parafinler ve polihidrik alkollerle (sorbitan monooleat gibi) hazırlanan yağ içinde su sistemleridir. Yaklaşık %15 miktarında su tutarak *stratum corneum*da oklüzif özelliği sağlar ve deriden nem kaybını önlerler.
- **Su ile yıkanabilen sıvağlar:** Emülsifiye bazlı sistemler absorpsiyon bazlılara benzemekle birlikte su içinde yağ sistemleridir. Emülsifiye edici madde su ile karışabilen bir formülasyon oluşturarak derinin su ile yıkanmasını sağlar. Formülasyon bileşiminde anyonik (sodyum lauril sülfat), katyonik (setrimid) veya

iyonik olmayan (setomakrogol) sürfaktanlar kullanılabilir. Sürfaktanlar etkin maddenin çözünmesini sağlayarak ve deri yüzeyini ıslatarak penetrasyon artırıcı etki oluşturur.

- **Suda çözünen sıvağlar:** Su bazlı sistemler su ile çözünebilen yüksek veya düşük molekül ağılıklı polietilen glikol (makrogol) içerirler. Bu etilen glikol polimerleri parafin analogları olup katı mumların/vaksların içine karışarak merhemlerin kimyasal olarak stabil, deri sıcaklığında yumuşak ve kolay yayılabilen özelliklere sahip olmasını sağlar. Formülasyon %10 civarında su içerdiğinde stabiliteleri düşüktür ayrıca fenol ve penisilin gibi bileşenlerle uyumsuzudurlar (Williams 2003 pp.173-174).

Merhem sıvağları tek bir madde veya bir karşım halinde formüle edilebilir. Formülasyon için seçilen sıvağ bazı özelliklere sahip olmalıdır: *i)* Deri üzerinde zararlı etkiler oluşturmamalıdır. Örneğin sulanma veya yağlanma hissi, leke oluşumu *ii)* Erime derecesi vücut sıcaklığına yakın olmalıdır, stabil olmalıdır *iii)* Kolay hazırlanabilmeli ve kolay temizlenebilmelidir *iv)* Uygun bir pH değeri olmalıdır *v)* Etkin madde ile geçimli olmalı, uygulama sonrası etkin maddenin salımını engellememelidir (Geçgil 1991 p.284; Değim 2007 p.355).

Merhem üretimi yapılırken merhem formülüne göre steril veya semisteril üretim yapılabilir. Normal şartlarda, soğukta çalışma ile eritme veya sıcakta çalışma metotları uygulanabilir. Merhemler hazırlanırken genel olarak etkin madde hazırlanır, sıvağ hazırlanır ve etkin madde ile sıvağ birlikte karıştırılır (Geçgil 1991 p.287).

Merhemlerde ısı ve ışık etkisi, pH değişimi, mikroorganizma bulaşması veya formülasyon hatalarına bağlı olarak fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik değişimler oluşabilir (Geçgil 1991 p.290).

Olası değişimleri incelemek için merhem sıvağlarında ve hazırlanan merhemde bazı kontroller yapılır. Sıvağlarda yapılan kontroller; erime derecesi tayini, sıvağın tuttuğu su miktarı tayini, asitlik derecesi, ester, iyot ve sabunlaşma indeksleri şeklinde sıralanabilir (Geçgil 1991 pp.290-291).

Merhemlerde yapılan kontoller ise homojenite kontrolü, ağırlık kontrolü, fiziksel kontroller (renk değişimi, kokuşma, katılaşma veya sulanma), viskozite ve pH olarak sıralanabilir (Geçgil 1991 p.291).

- **Homojenite kontrolü:** Merhem formülasyonu sürüldüğünde deri üzerinde homojen bir tabaka halinde yayılmalı ve pütürlü bir görünüşte (hava kabarcığı veya çözünmeyen partükül kaynaklı) olmamalıdır. Gözle veya mikroskop ile inceleme yapılabilir.
- **Ağırlık kontrolü:** Tüplerin önce dolu sonra içlerinin tamamen temizlenmiş olarak boş halde tartılıp preparat miktarının hesaplandığı kontroldür.
- **pH:** Formülasyon deriye uygulandıktan sonra acı hissi oluşturmamalıdır.
- **Viskozite:** Preparatın akıcılığı ve tüpten çıkartılabilmesi için gerekli kuvvet belirlenmeli ve bu özellikler her numunede kontrol edilmelidir.

Merhemlerde ayrıca kimyasal olarak **miktar tayini (dozaj) kontrolü** de yapılır (Geçgil 1991 p.291).

2.7. Mikroemülsiyonlar Hakkında Genel Bilgiler

2.7.1. Tanımı

Mikroemülsiyon terimi ilk kez 1943 yılında Hoar ve Schulman tarafından sabun ve kısa zincirli alkolleri içeren saydam görünümlü yağ içinde su dispersiyonunu tanımlamak için "*Oleopathic Hydro-Micelle*" olarak ifade edilmiştir (Hoar ve Schulman 1943). 1948 yılında Winsor, su, yağ ve amfifilik bileşen içeren bu karışımlar için Winsor I, II, III ve IV olarak dört farklı faz dengesi tanımlanmıştır (Winsor, 1948). 1959 yılında da Schulman ve ark. bu yapıları mikroskop ile inceleyerek mikroemülsiyon olarak adlandırmıştır (Schulman ve ark. 1959).

Mikroemülsiyonlar; sürfaktan ve kosürfaktan molekülleri ile yüzeyler arası bir film oluşturularak kararlı hale getirilmiş, yağ ve/veya su mikro bölgelerinden oluşan, termodinamik açıdan dayanıklı, saydam, izotropik ve düşük viskoziteli koloidal dispersiyonlardır (Hellweg 2002; Djekic ve ark. 2012; Kalaitzaki ve ark. 2014). Mikroemülsiyon damlacıkları miseller yapıdan daha büyük olduğu için "*şişkin miseller*" olarak da adlandırılırlar (Heisenberg 1995).

Mikroemülsiyonlar, konvansiyonel emülsiyonlardan yapısal ve fiziksel açıdan oldukça farklı koloidal sistemlerdir (Tablo 2-7) (Heuschkel ve ark. 2008).

Tablo 2-7: Mikroemülsiyonlar ve klasik emülsiyonlar arasındaki farklılıklar (Heuschkel ve ark. 2008)

Özellik	Mikroemülsiyon	Emülsiyon
Görünüş	Transparan/saydam	Süt görünümlü
Stabilite	Termodinamik olarak dayanıklı	Termodinamik olarak dayanıksız
Oluşum	Kendiliğinden	Enerji gerekir
Ara yüzey gerilimi	Neredeyse 0 mN/m	Yaklaşık 50 mN/m
Mikroyapı	Dinamik (dalgalı ara yüzey)	Statik (koalesansa kadar)
Optik izotropi	Vardır	Yoktur
İç faz büyüklüğü	<200 nm	>500 nm

2.7.2. Mikroemülsiyonların Yapısal Özellikleri

Mikroemülsiyonların saydam veya yarı saydam olmalarının nedeni, damlacık büyüklerinin küçük olmasından kaynaklanır (Heuschkel ve ark. 2008; Santos ve ark 2008). Mikroemülsiyonların, damlacık büyüklükleri; 60-200 nm (Lawrence ve Rees 2000); 5-100 nm (Moulik ve Paul 1998); 10-100 nm (Heuschkel ve ark. 2008); < 150 nm (Santos ve ark 2008); < 100 nm (Anton ve Vandamme 2011) olarak kayıtlıdır.

Mikromeülsiyonların oluşumunda, serbest enerjinin negatif olması termodinamik açıdan kararlı bir koloidal dağılım oluşumunu sağlar (Moulik ve Paul 1998, Heuschkel ve ark. 2008). Termodinamik kararlılık, damlacık boyutlarının uzun süre değişmeden kalmasına yardımcı olur. Ayrıca, mikroemülsiyonlar, çökme, flokülasyon ve koalesansa karşı da dayaklıdırlar (Shukla ve ark. 2003a; Santos ve ark 2008).

Yağ, su, sürfaktan ve kosürfaktanların bir arada formüle edilmesiyle, mikroemülsiyon dışında *hekzagonal* veya *lameler* kristal faz gibi farklı koloidal yapılar da oluşabilmektedir (Kreilgaard 2002; Lawrence ve Rees 2000; Santos ve ark 2008). Mikroemülsiyonlar ile diğer koloidal yapıları ayırt etmek için polarize ışık

mikroskobundan yararlanılmaktadır. Ayrıca, *hekzagonal* veya *lameler* kristal faz yapıları izotropik olmadıkları için çıplak gözle veya mikroskop görüntüleri ile ayırt edilebilmektedir (Santos ve ark 2008).

Mikroemülsiyonlar yapılarına göre; su içinde yağ (Y/S), yağ içinde su (S/Y) ve yağ ve su fazı birbiri içine geçmiş durumda/geçişli (*bicontinuous*) mikroemülsiyonlar olmak üzere üç tip olarak sınıflandırırlar.



Şekil 2-9: Y/S, Bicontinuous, S/Y Mikroemülsiyonların şematik gösterimi (Lawrence ve Rees 2000)

Mikroemülsiyonun S/Y veya Y/S tipinde oluşumu bileşenindeki sürfaktanın yapısı ile ilişkilidir. Sürfaktan molekülünün hacmi V, uzunluğu l ve baş kısmının alanı a kabul edilirse, kritik topaklanma parametresi (*critical packing parameter, CPP*) eşitlik 2-1'de gibi ifade edilir (Lawrence ve Rees 2000).

$$CPP = V\frac{a}{l} \qquad \textbf{(2-1)}$$

2.7.3. Mikroemülsiyonların Bileşenleri

Mikroemülsiyonlar hazırlanırken kullanılan bileşenler, toksik olmamaları, birbirleri ile uyumlu olmaları ve optimum dermal absorpsiyon sağlamaları (ilacın yüksek çözünürlüğü ve yüksek termodinamik aktivitesi kriterleri dikkate alınarak seçilir. Mikroemülsiyon koloidal sisteminin oluşabilmesi için üç temel koşul *i)* Su yağ ara yüzeyinde oldukça düşük bir yüzey gerilimin oluşturulması *ii)* Su yağ ara yüzeyinde akıcı bir sürfaktan filmi oluşturulması *iii)* Ara yüzeydeki sürfaktan film ile yağ fazı moleküllerinin birbirleri ile bütün olmaları ve birbirlerine penetre olmaları şeklinde sıralanabilir (Kreilgaard 2002).

Mikroemülsifikasyon için optimum olarak belirlenmesi gereken özellikler *i)* yağ-sürfaktan, kosürfaktan ve su fazının konsantrasyonları *ii)* yağ/sürfaktan ve sürfaktan/kosürfaktan oranları *iii)* sıcaklık *iv)* pH *v)* ilacın fizikokimyasal özellikleri (logP, pKa ve polarite) olarak sıralanır (Patravale ve Date 2009 p.261).

Formülasyonun bileşeni seçimlerinde önemli kiterlerden biri de kullanılan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan bileşenlerinin uygulama yolu ile uyumlu olmasının gerekliliğidir (Patravale ve Date 2009 p.261).

2.7.3.1. Yağ Fazı

Mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanırken yağ fazının seçimi diğer bileşenlerin seçimini de etkilebileceğinden son derece önemlidir. Formülasyonun yağ fazına yüklenecek madde miktarını artırmak için çoğunlukla etkin maddenin en iyi çözündüğü yağ tercih edilir (Vandamme 2002). Örneğin Barot ve ark. yaptıkları çalışmada oleik asit, isopropil miristat, zeytin yağı ve hint yağı arasından etkin madde terbinafinin en yüksek çözündüğü oleik asit seçilerek *in vitro* permeasyon çalışmalarına devam edilmiştir (Barot ve ark. 2012). Aynı zamanda bazı çalışmalarda ilacın deriden geçebilmesinin sadece yağ fazı içindeki çözünürlüğe bağlı olmadığı ve yağ fazının deri üzerindeki etkilerinden de kaynaklanabileceği gösterilmiştir (Lopes 2014). Örneğin ketoprofen içeren farklı yağlarla (oleik asit, isopropil miristat, Miglyol 812, Miglyol 840) hazırlanarak diğer bileşenleri ile miktarları sabit tutulan mikroemülsiyonların permeasyonları karşılaştırılmıştır. Çalışmada ilacın yağlardaki çözünürlüğü ile permeasyonu arasında bir korelasyon olmadığı gösterilmiştir (Zhang ve Mickniak-Kohn 2011).

Mikroemülsiyonlarda yağ fazı olarak; yağ asitleri, yağ alkolleri, yağ asiti ve alkollerin esterleri, orta zincirli tirgliseritler, gliserol ve asetik asitin triesterleri ve terpenler kullanılmaktadır (Santos ve ark 2008). Mikroemülsiyon formülasyonlarında sıklıkla kullanılan yağ fazlarına; isopropil miristat (Alvarez-Figueroa ve Blanco-Méndez 2001; Djordjevic ve ark. 2004; Podlogar ve ark. 2005; Gupta ve ark. 2005; Changez ve ark. 2006, Liu ve ark. 2006; Gürbüz ve ark. 2015), etil oleat (Alvarez-Figueroa ve Blanco-Méndez 2001; Chen ve ark. 2006); izostearil izostearat (Kreilgaard ve ark. 2000; Escribano ve ark. 2003) örnek verilebilir.

Kaprik ve kaprilik asitin orta zincirli trigliseritleri dermal uygulanan mikroemülsiyonlarda yağ fazı olarak kullanılmaktadır (Paolino ve ark. 2002; Valenta ve Schultz 2004). Oleik asit de penetrasyon artırıcı etkisi bilinen bir yağ asitidir ve yaygın olarak kullanılır (Peltola ve ark. 2003; Chen ve ark. 2004; Zhao ve ark. 2006; Tuncay ve Özer 2013; Erdal ve ark. 2016).

2.7.3.2. Sürfaktanlar

Mikroemülsiyon formülasyonlarında sürfaktan seçimi de mikro yapıyı etkileyebileceği için oldukça oldukça önemlidir. Montenegra ve ark. yaptıkları çalışmada sürfaktanın lipofilitesinin ve yapısının mikroemülsiyonun ara yüzey dizilimini etkileyerek etkin maddenin formülasyondan salımını değiştirilebildiğini göstermiştir (Montenegro ve ark. 2011).

Seçilen sürfaktan/sürfaktanların hem yağ fazı ile mikroemülsiyon oluşturabilmesi, hem de etkin maddeyi çözme kapasitesinin yüksek olması beklenir. Sürfaktanın seçilmesi, hazırlanması hedeflenen mikroemülsiyon tipine göre de değişmektedir. Hidrofilik-lipofilik denge değeri (HLB) düşük olan sürfaktanlar yağ içinde su; HLB değeri yüksek olanlar ise su içinde yağ mikroemülsiyonlarının hazırlanmasında tercih edilir (Patravale ve Date 2009 p.263).

Mikroemülsiyonların oluşturulması için, aynı zamanda uygulandığı deri üzerinde iritasyon oluşturma potansiyeli düşük olan, bir başka deyişle kullanılması güvenli olan, iyonik olmayan sürfaktanlar daha sıklıkla tercih edilmektedir (Santos ve ark 2008). Sentetik sürfaktanların iritasyon potansiyeli; katyonik > anyonik > amfoterik > non-iyonik sürfaktanlar olarak sıralanmaktadır (Guinedi ve ark. 2005).

Mikroemülsiyoların oluşturulması için, gliserolmonooleat propilen glikol (Arlacel 186); polioksietilen lauril eter (Brij 35), poliosietilen (20) sorbitan monolaurat (Tween 20), polioksietilen (20) sorbitan monostearat (Tween 60), polioksietilen (20) sorbitan monooleat (Tween 80), sorbitan monooleat (Span 80), Labrasol (Kaprilokaprol polioksi gliserit), Plurol oleik (Poligliserol oleat), Plurol izostearik (Poligliseril-6-izostearat), aerosil (Silikon dioksit), polietilen glikol 35 hint yağı (Kolliphor EL), polietilen glikol 40 hint yağı (Kolliphor RH 40) tercih edilen sürfaktanlardır (Kogan ve Garti 2006; Santos ve ark 2008; Heuschkel ve ark. 2008).

Fosfolipit gibi doğal kaynaklı sürfaktanların deri üzerindeki iritasyon potansiyelinin düşük olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Sahle ve ark. 2013). Ayrıca doğal ve yenilenebilir ham madde kaynaklarından oluşan alkil poli glikozitler (APG) de biyolojik olarak parçalanabilen, deriye karşı hassas sürfaktanlar olarak mikroemülsiyon oluşturulması için kullanılmıştır (Goebel ve ark. 2010).

2.7.3.3. Kosürfaktanlar

Yüzeyler arası gerilimi tek bir yüzey etkin madde ile düşürmek mümkün olmadığı için, ikinci bir yüzey etkin madde olarak kosürfaktanlar kullanılır (Heuschkel ve ark. 2008).

Kosürfaktanların etkisi üç esasa dayanır*: i)* Kosürfaktanlar ara yüzey filmi tabakasına ve mikroemülsiyon yapısına etki ederler. Örneğin kısa zincirli alkollerin baş bölgeleri kuyruk bölegelerine göre daha çok şişer (pozitif kıvrım), daha uzun zincirli alkollerin ise kuyruk kısmı baş kısmından daha çok şişer (negatif kıvrım). Bu durum mikroemülsiyonların tipini etkiler. *ii)* Kosürfaktanlar sürfaktan tabakasına penetre olarak, ara yüzey filminin akışkanlığını ve esnekliğini artırır. *iii)* Kosürfaktanlar kimyasal yapıya etki ederek ve bu yapının yağ/su çözünürlüğünü değiştirebilir (Patravale ve Date 2009 pp. 263-264).

Ayrıca formülasyona kosürfaktan ilave edilmesi ile, bileşimdeki sürfaktan miktarı azalacağından mikroemülsiyonların iritasyon oluşturma potansiyeli de düşürülebilmektedir (Djordjevic ve ark. 2004).

Etanol, 1,2-propandiol, 1,2-oktandiol, 1,2-hekzandiol, 2-etil-1,3-hekzandiol, izopropanol ve butanol kısa zincirli alkol yapısındaki kosürfaktanlardır (Santos ve ark 2008). Propilen glikol, butilen glikol, gliserol alkan diol ve triol yapısındaki kosürfaktanlardır. PEG 400 polietilen glikol yapısındakidir. Tetrahidro furfuril PEG eter (Glikofurol/tetraglikol) ve dietilen glikol mono etil eter (Transcutol) glikol eterlerine örnek kosürfaktanlardır. Özellikle Transcutol, amfifilik yapısı, penetrasyon artırıcı özelliği ve çözücü etkisi ile oral, topikal ve transdermal uygulamalarda sıklıkla kullanılan bir kosürfaktandır (Patravale ve Date 2009 p.265).

Mikroemülsiyon formülasyonlarında yer alan sürfaktan ile kosürfaktan konsantrasyonları ve oranları mikroemülsiyonun oluşumunu, damlacık boyutunu, agregatların şeklini ve su çözündürme kapasitesini etkilemektedir (Lawrence ve Rees 2000; Heuschkel ve ark. 2008 ; Djekic ve Primorac 2008; Hosmer ve ark. 2009).

2.7.3.4. Su fazı

Mikroemülsiyonlarda su fazı olarak çoğunlukla su tercih edilir. Bazı durumlarda viskozite artırıcılar, penetrasyon artırıcılar, koruyucular ve elektrolitler de sulu faza eklenebilir (Santos ve ark. 2008). Ancak bu yardımcı maddeler, hazırlanan

mikroemülyonun koşullarını etkileyebilir. İzotonik hale getirme, mikroemülsiyonların bileşiminde iyonik sürfaktan bulunduğunda, faz diyagramlarını, non-iyonik sürfaktan olduğunda ise faz dönüşüm sıcaklığını değiştirilebilir. Diğer önemli faktör ise, mikroemülsiyonların faz davranışlarını etkileyen pH değeridir (Patravale ve Date 2009 pp.265-266).

2.7.3.5. Etkin madde

Mikroemülsiyon formülasyonuna yüklenen etkin maddenin logP, pKa, moleküler yapı ve molekül ağırlığı gibi fizikokimyasal özellikleri mikroemülsiyonun faz davranışını ve yapısını etkiler. Bazı durumlarda formülasyonun iletkenlik ve reolojik özellikleri de yüklenen etkin maddenin etkisi ile değişebilir. Etkin maddenin yükleme miktarı mikroemülsiyonun damlacık boyutunu etkiler (Patravale ve Date 2009 p.266-267).

2.7.4. Mikroemülsiyon Hazırlanması ve Üçgen Faz Diyagramlarının Oluşturulması

Mikroemülsiyonlar, su, yağ ve sürfaktan-kosürfaktan karışımı olmak üzere üç farklı sıvı bileşenden oluşur. Mikroemülsiyonu oluşturan fazların oranlarını belirlemek ve mikroemülsiyon oluşum bölgesini saptamak amacı ile üçgen faz diyagramları kullanılmaktadır (Sintov ve Shapiro 2004; Zhao ve ark. 2014; Erdal ve ark. 2016).

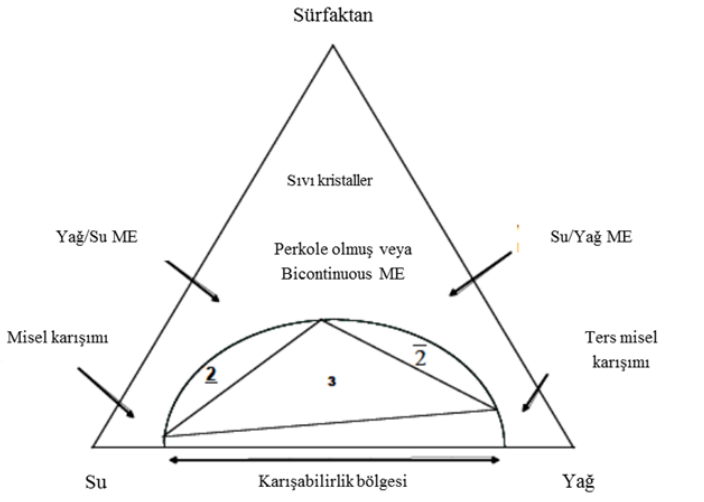
Mikroemülsiyon hazırlanmasında faz titrasyon yöntemi ve faz inversiyon yöntemi kullanılır. Faz titrasyon yönteminde mikroemülsiyon kendiliğinden oluşur ve faz diyagramı ile gösterilir. Faz diyagramının oluşturulması, farklı bileşenlerin birbirleri ile karıştırıldıklarında olabilecek etkileşimleri saptayabilmek için faydalı bir yaklaşımdır (Kumar ve ark. 2011). Bu yaklaşımda dört veya daha çok bileşen psödo-üçgen faz diyagramlarıyla kullanılarak araştırılabilir (Lawrence ve Rees 2000).

Su ile titrasyon yöntemi ile mikroemülsiyonların oluşturulması için; manyetik karıştırıcı üzerinde sabit devirde karıştırılan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan karışımı üzerine bulanıklık oluşana kadar su ilave edilir ve üçgen faz diyagramları oluşturulur (Sintov ve Shapiro 2004; Zhao ve ark. 2014; Erdal ve ark. 2016). Bir diğer yöntemde ise, sürfaktan, yağ ve su fazları karıştırılarak, sistem berrak olana kadar kosürfaktan ile titrasyon yapılarak üçgen faz diyagramları oluşturulur (Bhargava ve ark. 1987; Attwood 1994).

Faz inversiyon yönteminde mikroemülsiyon disperse olan fazın aşırısının eklenmesiyle ya da sıcaklığın yükseltilmesiyle meydana gelir. Faz değişimi sırasında

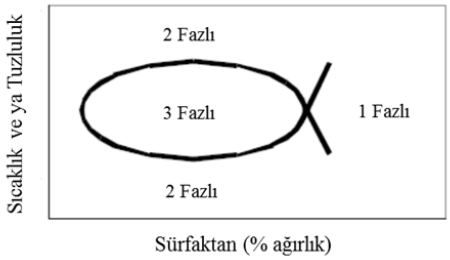
şiddetli fiziksel bir değişim gerçekleşir. Hatta bu değişim damlacık boyutunu değiştirebileceğinden ilacın *in vitro* ve *in vivo* salımına da etki edebilir (Kumar ve ark. 2011).

Üçgen faz diyagramlarının her bir köşesi, üç bileşenden birinin %100, diğerlerinin %0 olduğunu gösterir. Üçgenin kenarları üzerindeki her bir nokta, iki bileşenden oluşan bir karışıma ait içerik oranlarını verir. Üçgenin içindeki herhangi bir nokta, toplamı %100 olacak şekilde, üç bileşeni belli oranlarda içeren karışımı verir. Her bir kenar 100 eşit parçaya bölünerek, bir kenar üzerinde bileşenlerin hangisinin arttığını, hangisinin azaldığını saptayabilmek için; hep aynı yönde olmak üzere, her üç kenarın da saat yönünde veya tersi yönde hareket edilmesi gerekir. Üçgen faz diyagramlarının iki önemli özelliği vardır. Bunlardan birincisi, herhangi bir kenardan karşı köşeye çizilen doğru üzerindeki her noktada kenarı oluşturan bileşenlerin birbirine oranı sabittir. İkinci özellik, kenarlardan birine çizilen paralel üzerindeki her nokta için bileşenlerden birinin oranı sabittir. Sıcaklığın değiştirilmesi bileşenlerin birbirleriyle olan karışımını etkileyebileceğinden, faz diyagramları hazırlanırken sabit sıcaklıkta çalışılır (Sinko 2006 pp.54-55). Mikroemülsiyon bölgelerinin üçgen faz diyagramında gösterilişi Şekil 2-10'da yer almaktadır (Smith ve ark. 2004).



Şekil 2-10: Yağ, su ve sürfaktandan faz diyagramı (Smith ve ark. 2004)

Mikroemülsiyonların faz davranışları, sıcaklığın ve sürfaktan miktarının bir fonksiyonu olarak açıklanır. Şekil 2-10'da gösterilen karışabilirlik bölgesi içinde iki ve üç fazlı sistemler, dışında ise tek fazlı sistemler oluşur (Smith ve ark. 2004).



Şekil 2-11: Yağ, su ve sürfaktandan oluşan üçlü karışımın sıcaklığın ve sürfaktan miktarının bir fonksiyonu olarak faz davranışı (Smith ve ark. 2004)

Şekil 2-11'de gösterilen "fish cut" balık şeklindeki faz diyagramına göre, düşük sürfaktan konsantrasyonlarında bütün sıcaklık değerlerinde "*2 fazlı*" sistemler oluşur. Yüksek sürfaktan konsantrasyonlarında "*1, 2 ve 3 fazlı* " sistemler oluşur. Tek fazlı bir sistemin oluşabilmesi için gereken sürfaktan konsantrasyonu yağ-su oranına, sıcaklığa ve tuzluluğa bağlıdır (Smith ve ark. 2004).

2.7.5. Mikroemülsiyonların Oluşum Teorileri

Mikroemülsiyonların oluşumu ve kararlılığı üç teori ile açıklanır: *i)* Yüzeylerarası karışık film teorisi *ii)* Çözünürlük teorisi *iii)* Termodinamik teorisi (Lawrence ve Rees 2000).

Mikroemülsiyonlar, termodinamik özellikler açısından oldukça özel koloidal taşyıcılardır ve herhangi bir enerji gerektirmeden oluşurlar (Moulik ve Paul 1998). Mikroemülsiyonların oluşumu sırasında açığa çıkan serbest enerjinin kaynağı, su ve yağ ara yüzey gerilimini düşürmek için kullanılan sürfaktan olarak açıklanmıştır (Lawrence ve Rees 2000).

Gibss-Helmholtz eşitliğine göre, kendiliğinden oluşan işlemler negatif serbest enerji ile nitelendirilir. Bu eşitlik aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad \textbf{(2-2)}$$

ΔG; serbest enerjiyi, γ ara yüzey gerilimini, ΔA; oluşum sürecindeki ara yüzey gerilimindeki değişimi, ΔS; entropideki değişimi ve T ise sıcaklığı göstermektedir.

Mikroemülsiyon oluşumunda; ara yüzey alanı önemli ölçüde artarken, her zaman pozitif değerli olmakla birlikte ara yüzey gerilimi azalır. Ara yüzey enerjisi (γA) entropideki yüksek oranlı değişim ile dengelendiğinde, negatif serbest enerji oluşur. Ara yüzey gerilimini düşürmek için sadece bir sürfaktan yeterli olamayacağı için, ara yüzeye

penetre olan ve ara yüzeyin akıcılığını artıran amfifilik bir kosürfaktan da formülasyon bileşimine ilave edilir (Lawrence ve Rees 2000; Heuschkel ve ark. 2008; Santos ve ark. 2008).

2.7.6. Mikroemülsiyonların Fizikokimyasal Özellikleri

Mikroemülsiyonların karakterizasyonu için iletkenlik, damlacık boyutu ve dağılımı, pH, viskozite, refraktif indeks ölçümleri yapılır. Ayrıca, mikroemülsiyonlar görsel olarak değerlendirilir, fiziksel kararlılığın tayini için, santrifüj işlemi ve dondurma-çözme döngüsü uygulanır (El-Hadidy ve ark. 2012).

Saçılmış ışık bir düzlem boyunca polarize olur ve her bir partikül ışık dalgası oluşturur. Buna Tindal etkisi, ışığa Tindal ışığı denir (Attwood, 2002 p.75). Mikroemülsiyonların damlacık boyutu çok küçük olduğundan Tindal etki çok düşüktür, bu nedenle saydam görünürler (Shen ve ark. 2014).

Polarize ışık mikroskobu (PM) sıvı kristallerin karakterizasyonu için oldukça fazla kullanılan yöntemlerdendir. Bu teknikte, anizotropik özelliğe sahip sıvı kristal fazlar polarize ışık altında değerlendirilerek karakterize edilir. Anizotropi, maddenin fiziksel özelliğinin ölçüm yapılan yerine göre değişmesidir. Bu özelliğe dayanarak, farklı sıvı kristal fazlar farklı karakteristik biçimlerde görünürler (Beica ve ark. 2004). Liyotropik sıvı kristaller, yapılarındaki bileşenlerin oranlarına göre; lamellar, hekzagonal veya kübik sıvı kristal fazlardan birinde bulunabilirler. Moleküler agregatların kübik düzenlenmeye sahip olduğu kübik sıvı kristal fazlarda düzenlenme, miseller ve ters miseller fazlara benzemektedir. Kübik fazların en önemli özelliği, izotropik yapı göstermeleri ve polarize ışık mikroskobunda karakterize edilememelidir (Burducea 2004). Yani mikroskop altında bakıldığı zaman karanlık bir görüntü elde edilir. Mikroemülsiyonlar da izotropik yapıya sahip olduklarından polarize mikroskop altında karanlık görünürler (Hathout ve ark. 2010a).

Mikroemülsiyonların damlacık büyükleri çok küçük olduğundan ışık mikroskobu karakterizasyonlarının tespiti için elverişli olmamaktadır (Santos ve ark. 2008). Elektron mikroskopları, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) (Changez ve ark. 2006) ve dondurarak kurutma teknolojisiyle birleştirilmiş şekli olan transmisyon elektron mikroskobu (FF-TEM) (Jahn ve Strey 1988; Danino ve ark. 2001) şekilleriyle kullanılarak mikroemülsiyonların karakterizasyonu saptanır. Boyut ölçümleri için ışık saçılım yöntemleri de kullanılır. Bu yöntemler, Küçük açılı x ışını saçılımı (SAXS)

(Podlogar ve ark. 2004), statik ışık saçılımı (SLS), dinamik ışık saçılımı (DLS) (Constantinides ve Scalart 1997; Ktistis 1998) ve küçük açılı nötron saçılımı (SANS) (Shukla ve ark. 2002) olarak sıralanır.

Polidispersite indeksi, partikül büyüklüğünün dağılımını ifade eder. Mikroemülsiyonlarda ise damlacık boyutlarının homojenliği hakkında bilgi sağlar (Moulik ve Paul 1998).

Bir maddenin refraktif indeksi, bir ortamdan diğerine geçen paralel ışın demetinin yönünde meydana gelen değişikliğin (kırılma) saptanmasıyla belirlenir (Refraktometri, Erişim tarihi 14.10.2016). Mikroemülsiyonlarda yapılan refraktif indeks ölçümleri ise formülasyonların saydamlığı ile ilgili değerlendirmelerin yapılmasını sağlar (Silva ve ark. 2009).

İletkenlik ölçümleri mikroemülsiyonların sürekli fazının değerlendirilmesi ve perkolasyon eşiğinin belirlenmesi amacıyla yapılır. Dış fazı su olan mikroemülsiyonların elektriksel iletkenlikleri yüksek değerlerdedir. Dış fazı yağ olan mikroemülsiyonların iletkenlikleri değerleri ise oldukça düşüktür veya yoktur (Moulik ve Paul 1998; Hathout ve ark. 2010a).

Mikroemülsiyonların pH değeri uygulanabilirliği açısından değerlendirilebilir. Formülasyonun pH'sının derinin normal pH değerinden çok yüksek veya düşük olması deride iritasyona neden olabilir (Ge ve ark. 2014).

Mikroemülsiyonların viskoziteleri, sürfaktan filmin kalınlığı, damlacık büyüklükleri hakkında bilgi verir (Lawrence ve Rees 2000). Mikromeülsiyonlar, Newton tipi akış gösterirler. Viskozite değerleri, formülasyon bileşenlerine ve en baştada bu bileşenlerden sulu faza bağlıdır (Moulik ve Paul 1998). Mikroemülsiyonlar akıcı sistemler olduğundan viskozite artırıcılar ile kıvamları artırılabilir. (Lopes 2014). Viskozite artışı etkin maddenin permeasyonunu artırabildiği gibi (Biruss ve Valenta 2008), etkin maddenin difüzyon hızını ve deriye partisyonunu da azaltabilir (Huang ve ark. 2008).

Zeta potansiyel ölçümleri, koloidal dağılımların fiziksel stabilitelerinin değerlendirilmesi için önemlidir. Mikroemülsiyonlar üzerinde yapılan zeta ölçümleri damlacıkların yükünü gösterir ve flokülasyon hakkında dolayısıyla stabilite hakkında bilgi verir (Sabale ve Vora 2016). Koloidal partiküller dispersiyon ortamında iyon

adsorbe ederler, bu nedenle pozitif ve ya negatif yüklenirler. Zeta potansiyeli partikülün üzerindeki net etkili yükü gösterir (Çelebi 2007 p. 271).

Mikroemülsiyonların fiziksel stabiliteleri belirli bir rpm hızda ve sürede santrifüj edilerek ve/veya 2-3 gün art arda dondurma çözme döngüsü (24 saat derin dondurucuda [-5ºC], 24 saat oda sıcaklığında bekletme) uygulanarak test edilebilir (El-Hadidy ve ark. 2012).

Mikroemülsiyonların karakterizasyonları, gerçekleştirilen ölçümlerle tayin edilebilir. Shukla ve ark. zor olanın formülasyonlardaki hacim fraksiyonunun belirlenmesi olduğunu ve nedeninin de sürfaktanların partisyon katsayısının bilinmemesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Bu yaklaşıma göre, sürfaktanın iç fazla bütünleştiği farz edilir ve hacim fraksiyonu dağılan fazın (sürfaktan ve yağ) toplamının formülasyonda yer alan tüm bileşenlerin toplamına oranlanmasıyla belirlenir. Hacim fraksiyon sabitinin $0,2 < \Phi < 0,4$ aralığında olmasıyla stabil ve kesin şekilli damlacıklara sahip mikroemülsiyonlar hazırlanabileceği belirtilmiştir (Shukla ve ark. 2003b).

2.7.7. Mikroemülsiyonların Avantaj ve Dezavantajları

Mikroemülsiyonlar termodinamik olarak kararlı, kolay hazırlanabilen, düşük viskoziteli, küçük damlacık boyutuna sahip ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

Mikroemülsiyonların avantajları şu şekilde sıralanır:

- Termodinamik açıdan kararlı olduklarından raf ömürleri uzundur.
- Üretilmeleri kolaydır ve üretim maliyetleri düşüktür.
- Kuvvetli çözündürme kapasitelerine sahiptirler. Hem hidrofilik, hem lipofilik özellikteki maddeler tek başına ve ya birlikte formülasyona yüklenebilir.
- İlaç yükleme kapasiteleri yüksek olması ve etkin maddenin iç fazda veya ara yüzeyde bulunması sayesinde, rezervuar gibi davranarak uzun süreli ilaç salımı sağlama amacı ile kullanılabilirler (Lawrence ve Rees 2000; Bagwe ve ark. 2001; Kreilgaard 2002; Chen ve ark. 2006; Kogan ve Garti 2006; Chen ve ark. 2007; Heuschkel ve ark. 2008; Heuschkel ve ark. 2009; Patravale ve Date 2009 pp.260-261; Hathout ve Elshafeey 2012).
- Topikal, oral, nazal ve transdermal uygulamaları vardır (Kumar ve ark. 2011).

- İlaç taşıma kapasiteleri yüksek olduğu için etkin maddenin biyoyararlanımını artırırlar (Araya ve ark. 2005).
- Terapötik özellik gösteren maddeleri enkapsüle ederek onların kimyasal, fotokimyasal ve enzimatik stabilitesini artırırırlar.
- Dermal ve nazal uygulamalarda dermal ve mukozal bariyerlere penetre olarak etkin maddenin terapötik etkisini artırırlar (Patravale ve Date 2009 p.261).

Mikroemülsiyonların dezavantajları ise aşağıdaki gibi sıralanır:

- Yüksek oranda sürfaktan içermelerinden ya da formülasyon bileşiminde kullanılabilen penetrasyon artırıcılardan dolayı alerjik ve iritan reaksiyonlara neden olabilirler (Bagwe ark. 2001;Kreigaard 2002; Kogan ve Garti 2006).
- Mikroemülsiyonların stabilitesi sıcaklık ve pH gibi çevresel koşullardan etkilenebilir (Muzaffar ve ark. 2013).
- Erime derecesi yüksek maddeler için çözündürme kapasiteleri kısıtlıdır (Muzaffar ve ark. 2013).

2.7.8. Mikroemülsiyonların Topikal/Transdermal İlaç Taşıyıcı Sistem Olarak Uygulanması

Topikal ve transdermal uygulanan ilaç taşıyıcı sistemler için derinin en üst tabakası olan SC temel bariyerdir. Derinin bariyer özelliğinin üstesinde gelebilmek, ilaç moleküllerini hedeflenen deri tabakalarına ulaşmasnı sağlamak ve derinin geçirgenliği artırmak için konvansiyonel formülasyonlara göre mikroemülsiyonlar önemli ilaç taşıyıcı sistemler olarak gösterilmektedir (Neubert 2011).

Mikroemülsiyonların topikal ya da transdermal ilaç taşıyıcı sistem olarak etkin maddelerin deriden penetrasyonlarının aşağıda belirtilen bazı potansiyel mekanizmalarla gerçekleştirdikleri düşünülmektedir (Lehmann ve ark. 2001; Kreilgaard ve ark. 2000; Yuan ve ark. 2006; Kogan ve Garti 2006; Teichmann ve ark. 2007; Santos ve ark 2008; Patravale ve Date 2009 p.269).

- Mikroemülsiyonlarda yüzeyler arası gerilim yok kabul edilebilecek kadar az olduğundan, *stratum corneum*'a çok hızlı bir şekilde penetre oldukları ve derinin lipit mantosu ile kolaylıkla karışabildikleri öngörülmektedir.
- Hazırlanmalarında kullanılan sürfaktan ve kosürfaktanlar *stratum corneum* lipit matriksini sıvılaştırabilmekte veya lipit ekstraksiyonuna yol açabilmektedirler.

Bu duruma bağlı olarak da topikal uygulanan mikroemülsiyonlar etkin maddelerin deriden geçişini önemli ölçülerde iyileştirebilmektedirler.

- Hidrofilik ve lipofilik ilaçları yüksek oranda çözme kapasiteleri, ilacın termodinamik aktivitesini, dolayısı ile konsantrasyon gradientini artırmaktadır.
- Konvansiyonel emülsiyonlarda yüzeyler arası membran filmde sürfaktanlar arasında oluşan güçlü etkileşimler, etkin maddenin formülasyonun iç ve dış fazları arasındaki hareketliliğini sınırlamaktadır. Mikroemülsiyonlarda ise yüzeyler arası filmin esnekliğe bağlı olarak, etkin maddenin fazlar arasındaki difüzyonu, SC'daki etkin maddenin dağılımını ve difüzyonunu kolaylaştırmaktadır.
- SC'un lipofilik yapısı göz önüne alındığında; yağ damlacıklarının Y/S tipi mikroemülsiyonlardan, S/Y sistemindeki su damlacıklarına oranla *epidermis*e daha kolay penetre oldukları düşünülmektedir. Yağ, *stratum corneum*daki çifte tabakaların hidrofobik kuyruklarına girerek ayrı bölgeler oluşturur ve böylelikle SC'da moleküllerin deriden geçişini artıracak bölgeler meydana gelir. Hidrofobik karakterdeki etkin maddelerin yağ damlacıklarına yüklenmesi ile *epidermis*e geçişlerinin arttığı bilinmektedir.

Deri kanseri, akne, *psoriasis,* dermatit, mikrobiyal ve fungal enfeksiyonlarda dermal ilaç uygulanmasının esas amacı, etkin maddenin derideki patolojik bölgelere (*epidermis* veya *dermis*) taşınabilmesi ve aynı zamanda sistemik absorpsiyonun en aza inidirilmesidir (Brown ve ark. 2006). Dolayısı ile mikroemülsiyon sistemine yüklenen etkin maddeden beklenen terapötik etkinliğe bağlı olarak, deriden emilimin artması istenilebileceği gibi, maddenin formülasyondan serbestleşerek derinin farklı katmanlarında birikmesi de tercih edilebilmektedir.

Etkin maddenin derinin tabakalarında birikimini sağlama potansiyeli bulunan mikroemülsiyonlar dermatolojik hastalıkların topikal yol ile tedavisi açısından avantajlı taşıycılar olarak gösterilmektedir. Mikroemülsiyon sistemin yapısına, etkin maddenin fizikokimyasal karakteristiklerine ve membran özelliklerine göre formülasyonda kullanılacak maddeler permeasyonu iyileştirici ya da geciktirici etki gösterebilmektedir (Sahle ve ark. 2012; Sahle ve ark. 2013).

2.8. Topikal Formülasyonların *In Vitro* Salım ve Penetrasyon Çalışmaları

Dermatolojik ürünlerde en az düzeyde sistemik etki ile derinin hedef tabakalarında beklenen ilaç konsantrasyonlarının sağlanması, etkin bir tedavinin gerçekleşmesi açısından topikal uygulanan ürünlerin formülasyon optimizasyonundaki temel yaklaşımdır (Shah ve Williams 2014 p. 61). Bu nedenle, topikal uygulanan ürünlerin geliştirilmesi için formülasyonlardan serbestleşen etkin maddenin ve derinin tabakalarındaki dağılımının değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

In vitro salım testleri, ürünlerde kritik kalite özelliklerini belirlemek için yapılır. Ürün performans testlerinde etkin maddenin formülayondan salımı değerlendirilerek *in vivo/in vitro* korelasyon aracılığı ile *in vivo* performansı hakkında fikir sahibi olunur (Shah ve Williams 2014 p. 62).

Bir etkin madenin deriden geçebilmesi için SC bariyerini aşması gerekir. SC bariyerinden penetrasyonu pasif difüzyon ile gerçekleşir. İlaç moleküllerinin deriden geçişi Fick'in Birinci Kanunu ile açıklanır.

Fick'in Birinci Kanunu'na göre;

$$J=\frac{dQ}{S.\,Dt}=K.\,D.\,\frac{(Cv-Ca)}{h} \qquad \textbf{(2-3)}$$

J : geçiş hızı= birim zamanda birim alandan geçen ilaç miktarı (mol/cm^2.s)

S: membranın yüzey alanı (cm^2)

h: membranın kalınlığı (cm)

D: membranda ilacın difüzitesi (cm^2/s)

K: membran ve faz 1 arasındaki ilacın partisyon katsayısı

C_v-C_a : membranın her iki yüzeyi arasındaki konsantrasyon farkı ifade etmektedir.

Etkin maddenin ortamdaki değişimi, doygunluğun çok altındayken yani "sink koşul" sağlandığında (pratikte çoğu durumda)

$C_V >>> C_a$ olur; $k_p = \frac{KD}{h}$ (permeabilite katsayısı; cm/s)

Bu durumda eşitlik; $J= k_p . C_v$ **(2-4)** şeklinde olur (Hadgraft ve Guy 2003).

2.8.1. *In vitro* Salım Çalışmaları

In vitro difüzyon çalışmalarında en sık kullanılan cihaz Franz tipi difüzyon hücresidir. Dikey, yatay ya da bir arada çalışacak şekilde tasarlanmış olabilirler. Hücreler su banyosuna oturtularak ya da ısıtma ceketleri yardımıyla (37°C) sabit sıcaklıkta çalıştırılırlar. Etkin maddeyi içeren donör kompartman, reseptör kompartmandan bir membran ile ayrılır. Reseptör fazdaki madde konsantrasyonunun artışı, membrandan difüze olan madde miktarının ölçülmesi ve zamana göre grafiğe geçirilmesi ile belirlenir (Değim 2007 p. 351).

2.8.2. *In vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmaları

Topikal biyoyaralanımın ölçülmesi oral uygulanan ilaçlara göre daha karmaşıktır. Topikal olarak uygulanan ilaçların dozu oldukça küçük miktardadır (2-5 mg/cm^2). Bu nedenle, serum ve idrar konsantrasyonları geleneksel yöntemler kullanılarak hesaplanamamaktadır. Diğer bir zor durum ise, etki bölgesi SC olan antifungal ilaçlar hariç derinin hedef bölgesindeki istenilen ilaç konsantrasyonun bilinmemesidir (Herkenne ve ark. 2008).

Topikal biyoyararlanım ve biyoeşdeğerliliğini klinik değerlendirmesi zaman alıcı ve pahalıdır. Mevcut olan yöntemler şu şekilde sıralanır: *i)* Bantla soyma yöntemi (*tape stripping*) *ii)* Mikrodiyaliz yöntemi *iii)* Deri biyopsisi *iv)* Bölgesel kesit ile *v)* Kıl foliküllerine ilaç taşınması *vi)* Konfokal Raman Spektroskopu (Herkenne ve ark. 2008).

In vitro çalışmalarda membran olarak insan derisi kullanımı hem etik ve yasal sınırlamalar hem de temin edilmesindeki zorluklar nedeniyle yaygın değildir. Bu durum kemirgen (saçsız fare, sıçan, guinea pig), sürüngen (yılan) ve memeli (maymun, köpek, domuz) derileri gibi altenatif modellerin kullanımına yol açmıştır. Domuz derisi kalınlığı ve permeabilite özellikleri açısından insan derisine benzerdir, ayrıca kesim evlerinden temini kolaydır. Bu nedenle *in vitro* çalışmalarda domuz derisi model membran olarak çoğunlukla kullanılır (Williams 2003 pp. 54-56).

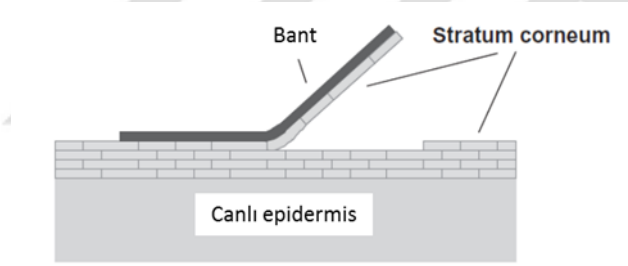
2.8.2.1. Bant ile Soyma Yöntemi (Tape stripping) Hakkında Genel Bilgiler

Bantla soyma yöntemi, SC tabakasının girilimşel olmayan bir prosedürle uzaklaştırılması ve örneklenmesi işlemidir. 0,2-1 μm kalınlıktaki mikroskopik tabakalar deri yüzeyinden, deri üzerine uygulanan yapışkan bantlarla toplanır. Sadece lipit matriks

içine gömülü ölü hücreler uzaklaştırıldığından, işlem göreceli olarak acısız ve girişimsel olmayan bir uygulamadır (Wiedersberg ve Nicoli 2012 p.109).

Bantla soyma yöntemi ile derinin bariyer fonksiyonu değerlendirilebilir, derinin patolojisi araştırılabilir ve gen ekspresyonu görüntülenebilir. Ayrıca, pestisit ve metaller gibi toksik maddelerin deriye maruziyeti de değerlendirilebilir (Wiedersberg ve Nicoli 2012 p.109).

SC topikal uygulanan ilaçların penetrasyonu için en önemli bariyerdir. Bu nedenle, dermatolojik hastalıklarda, bu tabakadaki ilaç miktarlarının canlı epidermis ve dermisteki ilaç miktarlarıyla ilişkili olduğu hipotezi savunulmaktadır. Rougier ve ark. ilk defa söz konusu hipotezi test etmiştir (Rougier ve ark. 1983; Wiedersberg ve Nicoli 2012 p.109). Bu nedenle bantla soyma yöntemi, hedef dokusu SC olan, antifungaller, ultraviyole filtreleri, keratolitikler ve antiseptikler gibi ilaç moleküllerinin topikal biyoyararlanımının değerlendirilmesinde de kullanılmaktadır (Wiedersberg ve Nicoli 2012 p.109-110).



Şekil 2-12: Bantla soyma yönteminin şematik gösterimi (Widerber ve Nicoli 2012 p.110)

Bantla soyma işleminde SC'undan uzaklaştırılan bantlardaki boynuzsu tabakanın ve etkin maddenin miktarı iç ve dış faktörlere bağlıdır (Lademann ve ark. 2009). Uygulama bölgesindeki korneositlerin büyüklüğü (Goshi ve ark. 2000), korneositlerin sayısı sayısı (Black ve ark. 2000), SC kalınlığı (Schwindt 1998), lipit tabakanın miktarı ve bileşimi (Greene ve ark. 1970) gibi anatomik özellikler önemlidir. Uygulama yapılan derinin TEWL ve pH değerleri ile bu değerlerin değişmesine yol açan mevsim koşulları da göz önüne bulundurulmalıdır (Bommannan ve ark. 1990).

Uygulama yapılacak kişinin yaşı, ırkı, deri tipi de dikkate alınmalıdır (Lademann ve ark. 2009). Bunlarla birlikte, topikal uygulanan madde miktarı ve uygulama prosedürü, (Weigmann ve ark. 1999) yapışkan bant tipi (Tsai ve ark. 1991), yapışkan bandı deriden

ayırma kuvveti (Löffler ve ark. 2004; Breternitz ve ark. 2007) gibi dış faktörlere de bağlıdır.

2.8.2.2. Bant ile Soyma Yönteminin Uygulanışı

Deriye uygulanan topikal formülasyon penetrasyonundan sonra SC'un bant ile soyulması işlemine başlanır. Bantla soyma işleminden önce deriye temizleme işlemi uygulanmamalıdır. Yapışkan bantlar, deride aynı alana art arda belirli bir basınçla uygulanır, sonra tek bir hareketle her defasında farklı bir yönde olmak üzere uzaklaştırılır. Uzaklaştırılan bant hem SC miktarını hem de topikal uygulanan etkin maddenin miktarının kapsar. İlk bant tamamen korneosit hücreleri ile doludur, uzaklaştırılan bant sayısı artıkça korneosit miktarı azalır. (Lademann ve ark. 2009).

Bantla soyma işleminin uygulacağı bölge kıllı, kaslı olmamalı ve yara izi bulundurmamalıdır. Kıllı bir bölge kullanılacaksa kılların makas ile kesilmesi gerekir. Prosedürde kullanılacak yapışkan bant sabit bir kalınlıkta, değişebilen bir uzunlukta ve uniform bir yapıya sahip olmalıdır. Ayrıca saydam ve esnek olmalı, deri ile uyumluluğu çalışma öncesi saptanmalıdır (Lademann ve ark. 2009).

Bantların deriden kaldırılma hızı ile ilgili standart bir çekme hızı olmalıdır çünkü bandın uzaklaştırılma hızı alınan SC miktarını etkiler. Örneğin bandın hızlı uzaklaştırılması SC miktarını azalmasına; yavaş uzaklaştırılması SC miktarının artmasına yol açar. Bu nedenle deney yapılırken sabit bir hız uygulaması oldukça önemlidir (Löffler ve ark. 2004). Deri üzerine bandın bastırılması için rulo veya sabit bir ağırlık kullanılması ve deneyin aynı kişi tarafından yapılması sonuçlarda sapmayı en aza indirir (Breternitz ve ark. 2007).

Bu prosedürde işleme başlamadan önce formülasyon fazlasının deri yüzeyinden deriye zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırılması gerekir. Ayrıca ilk bantta deriden absorbe olmamış etkin madde olabileceği de dikkate alınmalıdır. Ancak SC'a penetre olan etkin madde miktarının doğru bir şekilde değerlendirebilmek için ilk bant da dahil olmak üzere çalışmada kullanılan her bant ile uzaklaştırılan SC ve ilaç miktarının saptanması önemlidir (Marttin ve ark 1996; Lademann ve ark. 2009).

Bantla soyma yönteminde, banda yapışan *stratum corneum* miktarını saptamak için bantların tartılması (Bommannan ve ark. 1990), spektroskopik yöntem (Weigmann

ve ark. 1999), mikroskopik ölçümler (Lindemann ve ark. 2003) ve TEWL'nin ölçülmesi (Greene ve ark. 1970) gibi birçok yöntem tavsiye edilmiştir.

Bir formülasyon içinde deriye uygulanan etkin maddenin bantla soyma yöntemi uygulanarak dermal tabakalardaki miktar tayini için deriye uygulanan yapışkan bantlar tek tek veya belirli sayılarda kombine halde ektraksiyon çözeltisi içinde ekstre edilir ve ardından madde miktarı uygun analitik yöntemlerle saptanır (Herkenne ve ark. 2008; Gürbüz ve ark. 2015; Erdal ve ark. 2016).

2.9. Laser Taramalı Konfokal Mikroskop ile Görüntüleme Tekniği

Laser taramalı konfokal mikroskop (CLSM), deriye uygulanan taşıyıcı sistemlerin ve biyomoleküllerin davranışlarını incelemek için kullanılan bir görünteleme cihazıdır. Floresans propların kullanımıyla kimyasal ilaçlar ile biyolojik moleküllerin davranışları değerlendirilir. Örneğin; *i)* biyolojik sistemlerde etkileşim *ii)* hücresel alım *iii)* penetrasyon derinliği *iv)* deri içindeki penetrasyon yolları *v)* ilaçların ve biyomoleküllerin deri penetrasyonunun ölçülmesi ve *vi)* bazı deri hastalıkları için derinin morfolojik analizi yapılarak topikal tedavilerin etkilerinin değerlendirilmesidir (Rossetti ve ark. 2013 p.99).

Floresans mikroskopta deri dokusunu araştırmak zordur çünkü gelen ışık yansır ve saçılır. Bu nedenle melanin ve diğer kromoforlar görünür dalga boylarında önemli derecede söner (Cullander 1997 pp.23-37). CLSM bu sınırlamaların üstesinde gelebilir çünkü yüksek çözünürlükte görüntüleme, girişimsel olmayan optik ayırma ve üç boyutlu yapılandırma gibi özellikleri floresans ölçümlerin hassaslık, seçicilik ve çok yönlülüğü ile birleştirir (Pygall ve ark. 2007). Böylece deri içindeki farmasötik moleküllerin davranışlarının daha iyi anlaşılmasını sağlar.

CLSM tekniği ile ilaçların ve biomoleküllerin deri pentrasyonlarının derinliği ve yayılabilirliği hakkında bilgi sağlanırken ayrıca penetrasyon sırasındaki deri içinde izledikleri yollarda görüntülenebilir. Bu durumda CLSM farklı tekniklerle birlikte kullanılır (Rossetti ve ark. 2013 p.126). Bu tekniklere, raman spektroskopisi (Desai ve ark. 2010), diferansiyel taramalı kalorimetri ile dar ve geniş açılı x ışını saçılımı (Foldvari ve ark. 2010), oklüzif çalışmalar (Teeranachaideekul ve ark. 2008), taramalı elektron mikroskobu (Madsen ve ark. 2009) ayrıca infrared spektroskobuyla birleştirerek yürütülen dermatofarmakokinetik analiz (Hathout ve ark. 2011) örnek verilebilir. Söz konusu çalışmalarla tam olarak ilaç ve deri etkileşimi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2.10. *In Vivo* Çalışmalar

İnsan derisinin yapısnın aydınlatılması ve derinin bariyer işlevini yürüten SC'un incelenmesi *i)* topikal uygulanan ürünlerle epidermanın biyokimyası arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması *ii)* derinin bakım ve tedavisine yönelik formülasyonların geliştirilmesi *iii)* ilaç moleküllerinin deriden geçişlerinin incelenmesi açısından önemlidir. (Loden 2001).

Sağlıklı gönüllülerde deriye uygulanan formülasyonun deri üzerindeki etkileri hakkında bilgi sahibi olmak için biyofiziksel ölçümler yapılır. Bu ölçümler *i)* deri üzerinden gerçekleşen su kaybı (TEWL) *ii)* derinin hidrasyon seviyesi *iii)* derinin pH değeri *iv)* derideki eritem ve melanin düzeylerinin (Galzote ver ark. 2008 p.467) *v)* ATR-FTIR spektrometresi ile deri lipitlerinin yapısal düzeni analiz edilmesi olarak sıralanır (Schwarz ve ark. 2012).

Transepidermal su kaybı (TEWL) değerleri; sıcaklık ve nem gibi ölçüm koşullarına, SC'un bariyer bütünlüğü ve kalınlığı gibi penetrasyonunu belirleyen özelliklere bağlıdır (Galzote ver ark. 2008 p.470).

Derinin nem seviyesinin (hidrasyon) belirlenmesinde en çok tercih edilen yöntem ise derinin elektriksel kapasitesinin ölçülmesidir. SC'un nem derecesinin saptanması dermatolojide fizyolojik ve terapötik araştırmalar açısından oldukça önemli bir etkiye sahiptir (Güngör ve ark. 2011).

Derinin bariyer işlevi bozulduğunda veya deri bütünlüğünü kaybettiğinde TEWL değerleri artmakta ve derinini hidrasyonu bozulmaktadır. TEWL ve deri hidrasyonu ölçümleri ile SC bariyeri uygulanan tedavinin etkinliği açısından değerlendirilebilir (Jensen ve ark. 2009). Örneğin AD'li hastalarda TEWL'nin ölçülmesi hastalığın patofizyoloji hakkında bilgi sahibi olunmasını sağlar. AD'li bireylerde yapılan ölçümler sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında TEWL değerlerinde artış olduğu ve deri hidrasyonunda ise düşme olduğu kaydedilmiştir (Sakurai ve ark. 2002; Hon ve ark. 2008).

Deri, ter ve sebum bezleri sekrosyonun sağladığı asit bir manto (pH 4,5-6,5) ile örtülüdür. Bu sayede kimyasal ve mikrobiyal koruma sağlanır. Asit mantonun devamlılığı laktat-bikarbonat tamponuyla sağlanır. pH değerindeki değişiklik bakteriyel invazyon, hassaslaşma ve dermatit gelişimine yol açar (Galzote ver ark. 2008 p.470). AD hastalığında da derinin pH değerinin arttığı bunun da serin proteaz aktivisinde artışa yol açarak epidermal bariyerde yapısal ve fonksiyonel değişiklere neden olduğu bildirilmiştir

(Elias ve Schmuth 2009). Derinin pH ölçümü yapılarak epidermal bariyer değerlendirilebilir.

Normal bir deriyi doğru analiz etmek veya patoloji bir deride yeterli bir teşhis için derinin renginin incelenmesi de önemlidir (Kitson 2008 p.14). Melanin pigmentlerinin yapısı ve miktarı, kan dolaşımı ve hemoglobin deri rengini etkileyen faktörler olarak sıralanabilir. Ayrıca ırk, cinsiyet, yaş ve hormon miktarı da deri rengi üzerinde etkilidir (Yun ve ark. 2010). Derideki eritem ve melanin düzeylerinin ölçülmesiyle derinin rengi değerlendirilir.

2.11. *In Vitro ve In Vivo* Koşullarda ATR-FTIR (Hafifletilmiş Toplam Yansımalı Kızılötesi Spektroskopisi/ Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy) Spektroskopisi Analizleri

Infrared (IR) spekroskopisi, derinin, özelikle de SC'un bariyer fonksiyonun değerlendirilmesinde kullanılan biyofiziksel bir yöntemdir (Naik ve Guy 1997 pp. 87-162). ATR-FTIR ise, özel bir IR tekniği olan hafifletilmiş toplam yansıtma spektroskopisidir (Prasch ve Förster 2002) ve özellikle *in vivo* koşullarda derinin bariyer işlevinin araştırılması açısından önemli bir yöntemdir (Stuart 2004 pp.138-140).

ATR-FTIR yöntemi ile yapılan analizlerde çalışma prensibi, analizi yapılacak örneğin IR'yi geçiren özel bir kristal yüzeyi ile temasına dayanır. IR radyasyonun penetrasyon derinliği 0,3-3 μm arasındadır. Ancak, bu derinlik cihaza, ATR kristaline, ilgilenilen dalga boyuna ve deri örneğinin nem içeriğine de bağlıdır. Bu nedenle, deri numunesi ATR ile doğrudan analiz edildiğinde, spektrumundan elde edilen bilgi kristal ile temas eden ilk tabakalara ait olur. Daha derin tabakaların yapısal bütünlüğü hakkında değerlendirme yapabilmek için bant ile soyma yöntemi kullanılmaktadır (Güngör ve ark. 2011).

ATR-FTIR tekniğinin önemli bir avantajı örnek hazırlanmasına gerek duyulmamasıdır. Dolayısıyla örnek hazırlanmasından kaynaklı oluşacak hatalar ortaya çıkmaz (Pirot ve ark. 1997).

ATR-FTIR spektroskopisi, SC'da hücreler arası lipitlerin düzeninde meydana gelen değişikliklerin moleküler düzeyde ölçülmesini sağlar. Farmasötik formülasyonlar geliştirilirken hem formülasyon bileşenlerinin hem de formülasyonun deri konformasyonu üzerinde oluşturduğu etkiler de bu teknik ile incelenebilmektedir (Hathout ve ark. 2011; Schwarz ve ark. 2012; Schwarz ve ark. 2013; Erdal ve ark. 2016).

Deri örneklerinin ATR-FTIR analizlerinde, SC yapısal bütünlüğünün değerlendirilmesi için en çok hidrofobik alkil zincirlerine bağlı lipit absorbans değerleri bilgi vermektedir. SC'daki hücrelerarası lipitlerde meydana gelen alkil zincir düzenindeki bozulmalar, karbon-hidrojen (CH_2) asimetrik (2920 cm^{-1}) ve simetrik (2850 cm^{-1}) gerilme bantlarının dalga numaralarının yüksek değerlerde olması ile karakterize olur. Bu durum "blue shift" olarak tanımlanır (Naik ve Guy 1997 pp. 87-162).

Tipik olarak, hekzagonal tip çifte tabakalı yapılar için CH_2 simetrik gerilme bandına ait dalga numarası değeri 2850 cm^{-1}'i geçmemektedir. Bu durum, SC'da düzenli alkil zincirlerinin olduğunu gösterir. Dalga numarasını 2852-2854 cm^{-1} arasında bulunması ise sıvı kristalize faz durumuna geçişi gösterir. Yani SC'un hücreler arası lipitlerinin alkil zincilerinin çok hareketli olduğu ve derinin bariyer bütünlüğünün de önemli oranda azaldığı anlaşılır (Gay ve ark. 1994; Chen ve ark. 2000).

Ayrıca, CH_2 gerilme bantlarının altında kalan alan da SC'daki lipit miktarları hakkında; bu absorbansların bant genişliği ise lipitlerin yapısının düzeni hakkında bilgi verir (Lawson ve ark. 1998; Laugel ve ark. 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Takrolimus (Concord Biotech Limited)
- Fusidik asit (Ecros, S.A.)
- Oleik asit (Sigma-Aldrich)
- Labrasol (Kaprilokapril makrogol-8 gliseritleri) (Gattefosse)
- Kolliphor RH 40 (Cremophor RH 40, Makrogol-gliserol hidroksistearat) (BASF)
- Kolliphor EL (Cremophor EL, Makrogol-gliserol risinoleat) (BASF)
- Tween 20 (Polietilen glikol sorbitan monolaurat) (Sigma-Aldrich)
- Tween 80 (Polietilen glikol sorbitan monooleat) (Sigma-Aldrich)
- Transcutol P (Yüksek saflıkta dietilen glikol monoetil eter) (Gattefosse)
- Capryol 90 (Propilen glikol monokaprilat Tip II NF) (Gattefosse)
- Lauroglycol FCC (Propilen glikol monolaurat Tip I EP/NF) (Gattefosse)
- Labrafac PG (Propilen glikol dikaprilokaprat EP) (Gattefosse)
- PEG 400 (Kollisolv PEG E 400, Polietilen glikol 400) (Sigma-Aldrich)
- Propilen glikol (Merck)
- İzopropil miristat (Merck)
- Vazelin (Petroyağ)
- Balmumu (Kahl GmBh Co)
- Katı parafin (Tuda Petrol)
- Sıvı parafin (Tuda Petrol)
- Butil hidroksi anisol (BHA) (Merck)
- Butil hidroksi toluen (BHT) (Merck)
- Vitamin E (BASF)

- Propilen karbonat (Sigma-Aldrich)
- Disodyum EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) (Merck)
- Benzoik asit (Merck)
- Asetonitril (Merck)
- Orto fosforik asit (%85) (Merck)
- Ter-butil metil eter (Merck)
- Sodyum klorür (Merck)
- Potasyum klorür (Merck)
- Disodyum hidrojen fosfat (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)
- Ultra saf su (Elga, Pure Lab Option DV 25)
- Tissue Freezing Medium (125 mL, Leica)
- Nil Kırmızısı (Sigma-Aldrich)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Damlacık büyüklüğü ve dağılımı ile Zeta potansiyeli ölçüm cihazı (Malvern Zetasizer-Nano ZS)
- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu, Model LC 20 AT ve Waters 2696 Separations Module)
- Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS Agilent 6530 Q-TOF)
- HPLC Kolonu (C_{18}, 150 x 4.6 mm, 3 µm GL Sciences InertSustain)
- HPLC Kolonu Kolon (C_{18}, 50x3 mm, 2,7 µm, Poroshell EC)
- HPLC Ön Kolonu (C_{18}, 10 x 2.1mm, 3 µm, GL Sciences InertSustain)
- HPLC Ön Kolonu (C_{18}, 10x4 mm, 3 µm, GL Sciences InertSustain)
- Franz Difüzyon Hücresi Sistemleri (PermeGear, V6A karıştırıcı ile 4G-00-00-15-12-VD tipi cam hücreler ve V6A-02 karıştırıcı 4G-00-00-25-14-VD tipi cam hücreler)

- ATR-FTIR Spektroskopisi (Perkin Elmer ZnSe Spectrum One)
- Polarize Mikroskop (Leica DM 2700 P) ve Mikroskop kamerası (Lieca DMC 2900)
- Ultrasonik Banyo (Bersonici ve Bandelin DK 1028 P)
- Teraziler (Denver Instruments, TB Series ile Matler Toledo Model XP205 ve Model XP56)
- Santrifüj (Hettich, D-7200, Type 2041 ve Nüve NF 412)
- Orbital Karıştırıcı (Thermo Electron Corporation, Model 420 ve Heidolph UNİMAX 2010)
- Etüv (BINDER)
- Manyetik Karıştırıcı (IKA-Werke, RT 15)
- pH metre ve Kondüktometre (Oakton Eutech Instruments Bench 2700 series ile Mettler Toledo mV/ORP ve TDS/SAL/Resistivity)
- Su Banyosu (ThermoHaake SWB 25)
- Mekanik Karıştırıcı (Heidolp RZR 20151 Control)
- Brookfield Viskozimetri DVIII +Rheometer serisi
- Distile Su Cihazı (Elga, Pure Lab Option DV 25)
- Refraktometre (Abbe 5 Refraktometre b+S Code 44-571)
- Elektrikli Dermatom (Zimer Electirc Dermatom, UK)
- Mikropipetler 100-1000 µl ve 10-200 µl (Eppendorf)
- Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) (Leica TCS SPE 5)
- Kriyomikrotom Cihazı (Leica CM 1850 UV)

3.1.3. Kullanılan Malzemeler

- Tek Kullanımlık Küvet
- Zeta Küvveti (Folded Capillary Cell)
- HPLC Örnek Şişeleri

- Mikropipet Uçları
- Cam Malzeme (Beher, Erlen, Cam Şişe, Balon Joje, Pipet)
- Eppendorf Tüpleri (1,5 mL ve 2 mL)
- Spatül (İnce ve Kalın Uçlu)
- Plastik Tüp ve Kapakları (15 mL ve 50 mL)
- Damlalık ve Puar
- Yapışkan Bant (Scotch 3M Book Tape 3 M, 845, St. Paul, MN, USA)
- Domuz Derisi (Yerel Bir Kesim Evinden Sağlanmıştır)
- Selüloz Nitrat Membran Filtre (0,45 µm, 50 mm, Sartorius)
- Millex-LCR Filtre (PTFE, 0,45 µm; 4 mm ve 13 mm çap, Milipore)

3.1.4. Kullanılan Bilgisayar Programları

- Microsoft Excel 2010
- Microsoft Word 2010
- GraphPad Prism 5.01
- Grapher 9.6.1001

3.2. Yöntemler

3.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

3.2.1.1. Etkin Maddelerin İnfrared (IR) Spektrumu

FTIR spektroskopisi katı maddelerin parmak izlerinin (*fingerprint*) belirlenmesini sağlar (Takka ve ark. 2007 p. 127). Bu çalışmada toz halde takrolimus ile fusidik asit ayrı ayrı olarak ve karışım halinde cihaza yerleştirildi. Sistem absorpsiyon modunda çalıştırıldı.100 Newton kuvvet uygulanarak 4000-650 cm^{-1} dalga boyu aralığında, 4 cm^{-1} çözünürlükte spektrum alındı.

3.2.1.2. Etkin Maddelerin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizleri

Diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC), bir madde örneğinin fiziksel ve kimyasal değişimlere bağlı, sıcaklığın fonksiyonu olarak yapının kaybettiği veya kazandığı ısıyı gösterir. Yöntemin esası; test örneği ile referansın aynı sıcaklıkta kalmalarını sağlamak

için gereken enerjinin ölçülmesidir (Takka ve ark. 2007 p. 127). Toz halde takrolimus ve fusidik asit ayrı ayrı olarak ve fiziksel karışım halinde alüminyum kapsül içine konuldu ve preslendikten sonra alete yerleştirildi. 50-300 ºC sıcaklık aralığında, 10 ºC/dk hızında, azot gazı akışı altında termogramlar alındı.

3.2.1.3. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenlerindeki Çözünürlük Çalışmaları

Takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin mikroemülsiyon ve merhem formülasyonlarında kullanılması planlanan yağ, sürfaktan ve kosürfaktanlardaki çözünürlükleri incelendi. Bu amaçla eppendorf tüplere Tablo 3-1'de yer alan yardımcı maddelerden takrolimus ile çalışırken 500'şer ve fusidik asit için 1000'er µL alındı, üzerlerine etkin maddelerin aşırı miktarları ayrı ayrı eklendi. Etkin maddelerin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü "çalkalama metodu" ile incelendi. Etkin madde-yardımcı madde karışımları oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda 300 rpm hızda 24 saat süre ile çalkalandı. Sürenin sonunda, tüpler 15,000 rpm hızda 10 dk. süre ile santrifüj edilerek, fiziksel karışımlarda çözünmeden kalan etkin madddelerin çöktürülmesi sağlandı. Üstteki sıvı kısım plastik tüplere alındı, asetonitril ve su karışımı (70:30, h:h) ile seyreltildi, vorteks ile karıştırıldı. Seyreltilen örnekler 0,45 µm Millex-LCR (PTFE) filtre ile süzülerek HPLC şişelerine alındı. Bu işlem her bir karışım için 3 defa tekrarlandı. Hazırlanan örnekler HPLC yöntemi ile analiz edildi.

Tablo 3-1: Etkin maddelerin mikroemülsiyon ve merhem formülasyonları bileşenlerindeki çözünürlük çalışmalarında kullanılan yardımcı maddeler

Yardımcı Maddeler	Oleik asit, Capryol 90, Lauroglycol FCC, Labrafac PG, Tween 80 Tween 20, Labrasol, Kolliphor EL, Kolliphor RH 40, PEG-400 Transcutol P ve Propilen glikol

3.2.1.4. Etkin Maddelerin Çözünme Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmaları

In vitro salım çalışmalarında reseptör faz olarak fizyolojik koşulu taklit eden izotonik hale getirilmiş pH 7,4 fosfat tamponu (PBS, Phosphate buffered saline) tercih edilir. Ancak etkin maddelerin çözünürlüklerinin düşük olması durumunda, çözünme ortamının sonsuz seyrelme (*sink*) koşulunu sağlaması için, propilen glikol (Hosmer ve ark. 2009), etanol (Lei ve ark. 2013) ve PEG 400 (Choa ve Shin 2012) gibi çeşitli yardımcı çözücü maddeler çözünme ortamına eklenebilmektedir. Takrolimus ve fusidik asitin düşük çözünürlüğü nedeniyle, pH 7,4 PBS'e %30 oranında propilen glikol, etanol

ve PEG 400 eklenerek farklı çözünme ortamları hazırlandı. Her çözünme ortamından eppendorf tüplere 1000'er µL alınarak, üzerlerine takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin aşırı miktarları ayrı ayrı eklendi. Yöntem 3.2.1.3.'te anlatıldığı şekilde çalışıldı.

3.2.1.5. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenleri ile Safsızlık Çalışmaları

Takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin, mikroemülsiyon ve merhem formülasyonlarında kullanılması planlanan yardımcı maddeler ile arasındaki etkileşimin araştırılması için safsızlık çalışması yapıldı. Takrolimus ve fusidik asitin ve Tablo 3-2'de verilen yardımcı maddeler ile karışımları hazırlandı. Bu karışımlarda; etkin maddeler pazarda mevcut ürünlerindeki konsantrasyonlarında (%0,1 takrolimus ve %2 fusidik asit) yardımcı maddeler ise hazırlanacak formülasyonlarda kullanılabilecek en yüksek konsantrasyonda olacak şekilde ilave edildi. Bu doğrultuda, etkin maddelerin tek tek ve bir arada olacak şekilde Tablo 3-2'de verilen yardımcı maddelerle süspansiyon halde karışımları hazırlandı. Bu karışımlardaki etkin maddelerin stabiliteleri 40±2˚C sıcaklık ve %75±5 bağıl nem koşulunda, 15 gün ve/veya 30 gün süre ile izlendi.

Safsızlık çalışmalarında, ayrıca etkin maddeler katı halde tek olarak ve iki etkin maddenin toz karışımları hazırlanarak, aynı sıcaklık ve nem koşulunda 30 gün ve 60°C sıcaklıkta etüvde 7 gün bekletildi. Belirtilen süreler sonunda süspansiyon halde ve katı halde fiziksel karışımlar balon jojelere alındı. Asetonitril ve su çözücü karışımı (70:3; h:h) ile seyreltildi, vorteks ile karıştırıldı. Seyreltilen örnekler şırınga ucu (Millex-LCR, PTFE, 0,45 µm Milipore) filtre ile süzülerek HPLC şişelerine alındı ve HPLC'de analiz edildi.

Tablo 3-2: Etkin maddelerin mikroemülsiyon ve merhem formülasyonları bileşenleri ile safsızlık çalışmalarında kullanılan yardımcı maddeler

Yardımcı Maddeler	Oleik asit, Capryol 90, Kolliphor EL, Kolliphor RH 40, Transcutol P, Propilen glikol, Propilen karbonat, Triasetin

3.2.2. Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmaları

Mikroemülsiyon formülasyonlarını oluşturmak için literatürde kayıtlı su ile titrasyon yöntemi kullanıldı (Butani ve ark. 2014). Yağ, sürfaktan ve kosürfaktan karışımı

manyetik karıştırıcıda karışırken, bulanıklık oluşuncaya kadar damla damla saf su eklendi. Her su ilavesi sonrasında suyun tamamen karışması için bir süre beklendi, su ilavesi tamamlandığında, karışımın ağırlığı tartılarak sisteme eklenen su miktarı hesaplandı. Bulanıklık oluşan karışımlarda ise çalışma tekrarlanarak berraklığın korunduğu su miktarları saptandı. Mikroemülsiyon formülasyonları hazırlanırken Tablo 3-3'te verilen yağ, sürfaktan, kosürfaktan ve bu maddelerin farklı oranlardaki karışımları ile formülasyon çalışmaları yapıldı.

Tablo 3-3: Mikroemülsiyonların formülasyon çalışmalarında kullanılan bileşenler (yağ, sürfaktan, kosürfaktan ve oranları)

Yağ	Sürfaktan (S)	Kosürfaktan (KoS)	Sürfaktan-Kosürfaktan Oranı (S:KoS)	Yağ: [S:KoS] Oranı
Oleik asit, Capryol 90, Lauroglycol FCC Labrafac PG	Tween 80 Tween 20 Labrasol * Kolliphor EL * Kolliphor RH 40	PEG-400 Transcutol P Propilen glikol	1:1 1:2 2:1	1:9 2:8 3:7

(*) Kolliphor RH 40 (Cremophor RH 40) ve Kolliphor EL (Cremophor EL) yardımcı maddeleri hem sürfaktan hem kosürfaktan olarak mikroemülsiyon formülasyonlarında kullanılabilirler (Zhang ve Michniak-Kohna 2011; Gürbüz ve ark. 2015).

Hazırlanan formülasyonların görsel olarak incelenmesinin ardından, faz ayrımı olmayan, berraklığını koruyan ve %25-%50 aralığında su içeren mikroemülsiyon formüllerinin damlacık boyutu ve polidisperiste indeksleri (PDI) ölçüldü. Söz konusu mikroemülsiyonların yağ, sürfaktan (S) ve kosürfaktan (KoS) bileşimleri ile S:KoS ile Yağ:S-KoS oranları, Tablo 3-4, Tablo 3-5 ve Tablo 3-6'da sunulmaktadır.

Tablo 3-4: Bir sürfaktan ve bir kosürfaktan içeren mikroemülsiyon formülleri

Formül kodu	Yağ fazı	Sürfaktan	Kosürfaktan	S:KoS Oranı	Su fazı	Yağ: S-KoS Oranı
OLT	Oleik asit	Labrasol	Transcutol P	1:1	Su	1:9
OLC_{EL}		Labrasol	Kolliphor EL	1:1		1:9
OLC_{EL}-1		Labrasol	Kolliphor EL	2.1		1:9
OLC_{RH}		Labrasol	Kolliphor RH 40	1:1		1:9
$OC_{RH}T$		Kolliphor RH 40	Transcutol P	1:1		1:9
$OT_{80}T$		Tween 80	Transcutol P	1:1		1:9
$OT_{80}T$-1		Tween 80	Transcutol P	1:1		2:8
$OT_{80}T$-2		Tween 80	Transcutol P	1:1		3:7
$OT_{80}T$-3		Tween 80	Transcutol P	1:2		1:9
$OT_{80}T$-4		Tween 80	Transcutol P	1:2		2:8
OTT		Tween 20	Transcutol P	1:1		1:9
OTT-1		Tween 20	Transcutol P	1:1		2:8
$OC_{EL}T$		Kolliphor EL	Transcutol P	1:1		1:9
$OC_{EL}T$-1		Kolliphor EL	Transcutol P	1:1		2:8
$OC_{EL}T$-1		Kolliphor EL	Transcutol P	1:2		1:9
$OC_{EL}T$-3		Kolliphor EL	Transcutol P	1:2		2:8
$L_{PG}LC_{EL}$	Labrafac PG	Labrasol	Kolliphor EL	1:1		1:9
$L_{PG}LC_{EL}$-1		Labrasol	Kolliphor EL	1:1		2:8
CLT (1:1)	Capryol 90	Labrasol	Transcutol P	1:1		1:9
CLT (1:1)-1		Labrasol	Transcutol P	1:1		2:8
CLT (1:1)-2		Labrasol	Transcutol P	1:1		3:7
CLT (1:2)		Labrasol	Transcutol P	1:2		1:9
CLT (1:2)-1		Labrasol	Transcutol P	1:2		2:8
CLT (2:1)		Labrasol	Transcutol P	2:1		1:9
CLT (2:1)-1		Labrasol	Transcutol P	2:1		2:8
LLT (1:1)	Lauro glycol FCC	Labrasol	Transcutol P	1:1		1:9
LLT (1:1)-1		Labrasol	Transcutol P	1:1		2:8
LLT (2:1)		Labrasol	Transcutol P	2:1		1:9
LLT (2:1)-1		Labrasol	Transcutol P	2:1		2:8

Tablo 3-5: İki kosürfaktan içeren mikroemülsiyon formülleri

Formül kodu	Yağ fazı	Sürfaktan	Kosürfaktan kombinasyonu		S:KoS Oranı	Su fazı	Yağ: S-KoS Oranı
OTT-PEG	Oleik asit	Tween 20	Transcutol P	PEG 400	1:2	Su	1:9
OTT-PEG-1					1:1		1:9
OTT-PEG-2					2:1		1:9

Tablo 3-6: İki sürfaktan içeren mikroemülsiyon formülleri

Formül kodu	Yağ fazı	Sürfaktan kombinasyonu		Kosürfaktan	S:KoS Oranı	Su fazı	Yağ: S-KoS Oranı
OLT-C_{EL}	Oleik asit	Labrasol	Kolliphor EL	Transcutol P	1:1	Su	1:9
OLT-C_{EL}-1					1:2		1:9
OLT-C_{EL}-2					1:1		2:8

3.2.2.1. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesi

Formülasyon çalışmaları verileri doğrultusunda, mikroemülsiyonların oluşturulmasında kullanılacak yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktanlar ile sürfarktan:kosürfaktan oranları belirlendi. Mikroemülsiyonlardaki bileşenlerin konsantrasyon aralığını belirleyebilmek için üçgen faz diyagramları (Sintov ve Shapiro 2004; Zhao ve ark. 2014; Erdal ve ark. 2016) hazırlandı.

Mikroemülsiyon formülasyonları; sürfaktan-kosürfaktan (S:KoS) oranları 1:2, 1:1, 2:1 olarak, yağ fazının S-KoS karışımına oranı ise 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 olacak şekilde çalışıldı. Üçgen faz diyagramlarının oluşturulması için mikroemülsiyonlar hazırlanırken yöntem 3.2.2.'de belirtilen "su ile titrasyon yöntemi" kullanıldı. Her Y:S-KoS:Su karışımı görsel açıdan tek fazlı veya iki fazlı olmasına göre değerlendirildi. Bu çalışmada bulanıklaşma faz ayrımı olarak düşünüldü (Hathout ve ark. 2010a). Bulanıklaşan ve faz ayrımı oluşan karışımlar berrak olarak yeniden hazırlandı. Bu doğrultuda ilave edilen toplam su miktarı ile önceden belirlenen miktarda hazırlanan Y:S-KoS karışımının ağırlığı toplanarak toplam içerik ağırlığı belirlendi. Böylece her sistem için kullanılan yardımcı maddelerin yüzdeleri hesaplandı. Bu veriler yardımıyla üçgen faz diyagramları çizildi.

3.2.2.2. Mikroemülsiyonların Seçilmesi

Önformülasyon çalışmaları kapsamında yapılan çözünürlük ve safsızlık çalışmaları verileri ile etkin madde yüklü olmayan mikroemülsiyonların su tutma kapasiteleri, damlacık boyutu ve dağılımları, fiziksel görünümleri dikkate alınarak, ayrıca üçgen faz diyagramları da kullanılarak belirlenen mikroemülsiyon formülasyonları etkin madde yüklemek üzere seçildi.

Söz konusu mikroemülsiyonlardan yağ fazı Capryol 90, sürfaktanı Labrasol, kosürfaktan Transcutol P olan ve S:KoS oranları 1:1, 2:1, 1:2 belirlenen mikroemülsiyonlar sırasıyla **"**CLT (1:1)" "CLT (2:1)" ve "CLT (1:2)" olarak kodlandı.

Yağ fazı oleik asit olanlar ise sürfaktan bileşimi Labrasol:Kolliphor EL (SI:SII= 2:1), kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranı 1:1 olan mikroemülsiyon "OLT-CEL" olarak; sürfaktanı Labrasol, kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranı 1:1 olan mikroemülsiyon "OLT" olarak; sürfaktanı Tween 20, kosürfaktan bileşimi Transcutol P:PEG 400 (KoSI:KoSII=3:1) ve S:KoS oranı 1:2 olan mikroemülsiyon "OTT-PEG" olarak; sürfaktanı Tween 20, kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranı 1:1 olan mikroemülsiyon "OTT" olarak kodlandı.

3.2.3. Etkin Madde Yüklenmemiş Merhem Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmaları

Merhem formülasyonları hazırlanırken Tablo 3-7'de verilen sıvağ, sürfaktan ve çözücülerin farklı oranlardaki karışımları ile formülasyon geliştirme çalışmaları yapıldı. Formülasyonlar hazırlanırken oda sıcaklığında katı olan sıvağlar eritildi. Daha sonra çözücü veya çözücüler bu yağlı faza eklenerek oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı ve fomülasyonun homojen olması sağlandı. Elde edilen merhemler oda sıcaklığında bir süre bekletilerek formülasyon bütünlüğü açısından değerlendirildi.

Tablo 3-7: Merhemlerin formülasyonlarında kullanılan yağ, sürfaktan, çözücüler

Sıvağ	Sürfaktan (S)	Çözücü
Vazelin Sıvı parafin	Setostearil alkol Balmumu Katı parafin	Capryol 90 Transcutol P Propilen glikol Triasetin Propilen karbonat

Hazırlanan merhem formülasyonlarından çözücüsü Transcutol P ve Capryol 90 olan ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu ve/veya setostearil alkol kullanılarak hazırlanan merhemler "MR-TC" olarak kodlandı (MR-TC-1, MR-TC-2, MR-TC-3, MR-TC-4, MR-TC-5, MR-TC-6 ve MR-TC-7).

Çözücüsü Triasetin olan sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu ve/veya katı parafin-propilen glikol kullanılarak hazırlanan merhemler "MR-TA" olarak kodlandı (MR-TA-1, MR-TA-2, MR-TA-3, MR-TA-4 ve MR-TA-5).

Çözücüsü Propilen karbonat olan ve vazelin, sıvı parafin, balmumu ve/veya katı parafin-propilen glikol kullanılarak hazırlanan merhemler "MR-PC" olarak kodlandı (MR-PC-1, MR-PC-2, MR-PC-3, MR-PC-4 ve MR-PC-5).

3.2.4. Etkin Maddelerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi Çalışmaları

Formülasyonları geliştirilen takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin yapılan analizlerinde örneklerdeki miktarlarının hesaplanması için Amerika Farmakopesi'nde (USP, Amerika Farmakopesi 2013) takrolimus için kayıtlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanıldı. Her iki etkin maddenin tek bir analiz ile aynı kromatogramda piklerinin elde edilerek miktarlarının hesaplanması için USP'de kayıtlı yöntemde bazı değişiklikler yapılarak yöntem belirlendi.

HPLC yönteminin geliştirilmesi çalışmaları kapsamında; kayıtlı yöntemdeki hareketli fazın bileşiminde bulunan organik çözücü oranları artırılarak, kromatogramdaki her iki etkin maddeye ait piklerin alıkonma zamanlarının daha öne çekilmesi sağlandı. Her iki etkin maddenin analizlerde güvenilir bir şekilde miktar tayini limitlerini artırmak ve aynı zamanda piklerin keskinliği koruyarak kromatogramları elde etmek için, uygulanan örneklerin enjeksiyon hacmi artırıldı.

Geliştirilen HPLC yöntemi; takrolimus ve fusidik asitin çözünürlük çalışmaları, miktar tayini ve stabilite çalışmalarında hazırlanan örneklerdeki etkin maddelerin miktarlarının hesaplanmasında ve safsızlık analizleri için kullanıldı. Ayrıca, bu yöntem *in vitro* salım ve *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında elde edilen örneklerdeki fusidik asit miktar tayini için kullanıldı.

3.2.4.1. Analiz Çalışma Koşulları

Takrolimus ve fusidik asitin belirtilen örneklerdeki analizlerinde 150 x 4.6 mm, boyutlarında ve 3 µm partikül büyüklüğe sahip C_{18} HPLC kolonu kullanıldı. Ayırca, *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında, çalışmada kullanılan deri dokusundan gelen kirlilikleri önlemek için 10 x 4 mm boyutlarında, aynı partikül büyüklüğüne sahip C_{18} ön kolonu kullanıldı. Kolon sıcaklığı 60°C'ye ayarlandı. Hareketli fazın akış hızı 1,5 mL/dk. olarak uygulandı.

Analizler, her iki madddeyi içeren formülasyonların miktar tayini ve stabilite çalışmalarında hazırlanan örnekler için 205 nm ultraviyole dalga boyunda yürütüldü. Aynı formülasyonların safsızlık analizleri takrolimus için aynı dalga boyunda (205 nm) fusidik asit içinse 260 nm'de gerçekleştirildi. Diğer çalışmalardaki tüm örnekler için analizler 220 nm'de yapıldı.

3.2.4.2. Hareketli Fazın Hazırlanması

Takrolimus ve fusidik asitin miktar tayininde USP 36'da takrolimus için kayıtlı yöntemde verilen gradient koşulları optimize edildi.

Analizlerde kullanılan hareketli faz; A hareketli fazın ve B hareketli fazın gradient olarak kullanılmasıyla hazırlandı. A fazı çözeltisinin hazırlanması için %85'lik orto fosforik asit çözeltisinden 0,4 mL alındı ve 500 mL ultra saf su bulunan 1000 mL'lik balon jojeye aktarılarak karıştırıldı ve hacmine ultra saf su ile tamamlandı (Çözelti I). B fazı çözeltisinin hazırlanması için, asetonitril ile ter-butil metil eter (810:190; h:h) oranında karıştırıldı (Çözelti II). A hareketli fazı; Çözelti I: Çözelti II (4:1; h:h) oranında, B hareketli fazı; Çözelti I:Çözelti II (1:4; h:h) oranında karıştırılarak hazırlandı. Her iki faz da kullanılmadan önce en az 15 dk. ultrasonik banyoda degaze edildi.

Takrolimus ve fusidik asit safsızlıkları için aynı hareketli faz kullanıldı. Gradient koşulları miktar tayini yöntemine göre tekrar optimize edildi.

3.2.5. Takrolimusun HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Çalışmaları

Analitik yöntem validasyonu, bir test yönteminin kesin ve doğru bir şekilde sürekli olarak bekleneni gerçekleştirdiğinin kanıtlanmasıdır (ICH Tripartite Guideline Q2(R1) 2005). Kullanılan analitik yöntemin validasyonu için doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk/geri kazanım (accuracy), seçicilik (specificity), teşhis limiti

(detection limit), miktar tayini limiti (quantification limit) ve stabilite parametreleri çalışıldı.

3.2.5.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

Miktar tayini yönteminin validasyonu için 10 mg takrolimus hassas olarak tartılıp balon joyeye alındı. Üzerine asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edildi, vorteks ile karıştırılarak çözündürüldü. Hacim 10 mL'ye tamamlanarak 1000 µg/mL konsantrasyonda takrolimus içeren stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak eppendorf tübe aktarıldı, üzerine 1000 µL asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edilerek 2 mL'ye seyreltildi ve 500 µg/mL konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlandı.

500 µg/mL konsantrasyondaki ara stok çözeltiden seri seyreltmeler yapılarak sırasıyla 1000, 800, 1000, 1000, 800, 1000 µL alındı ve her biri asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile 2 mL'ye seyreltildi. Böylece sırasıyla 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Seyreltmelerin her basamağında standart çözeltiler önce vorteks ile karıştırıldı, sonra seyreltmeleri yapıldı.

3.2.5.2. Doğrusallık

Bir analitik yöntemde elde edilen bulguların örnek çözeltisi içindeki madde konsantrasyonu ile belli bir aralıkta olması yöntemin doğrusallığı olarak tanımlanır (ICH Tripartite Guideline Q2(R1) 2005).

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için yöntem 3.2.5.1.'de anlatıldığı gibi takrolimus stok çözeltisi ve ara stok çözeltisi hazırlandı. Bu ara stok çözeltiden seri seyreltmeler yapılarak 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan standart çözeltiler HPLC'ye enjekte edildi. 6 farklı konsantrasyonun 3 ayrı enjeksiyon ile elde edilen pik alanları hesaplanarak standart eğri çizildi. Doğru denklemi, determinasyon katsayısı (r^2), standart sapma (SD) ve relatif standart sapma (RSD) değerleri hesaplandı.

3.2.5.3. Kesinlik

Bir analitik yöntemde, belirli bir çalışma koşullarında hazırlanan aynı örnek çözeltisinden birden fazla seyreltme ile elde edilen bir serinin ölçümleri arasındaki

uyumun yakınlığı kesinlik olarak tanımlanır. SD veya % RSD değerleri ile ifade edilir. Yöntemin kesinliği için RSD değeri %2'den küçük olmalıdır (ICH Tripartite Guideline Q2(R1) 2005).

Analitik yöntemin kesinliğinin tayini için yöntem 3.2.5.1.'de belirtildiği gibi takrolimus stok ve ara stok çözeltileri hazırlandı. Ara stok çözeltiden 5, 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı ve aşağıda belirtildiği şekilde çalışıldı.

Gün içi kesinlik: Belirtilen konsantrasyonlardaki standart çözeltiler 3 kez analiz edildi. Elde dilen pik alanlarının ortalamaları, SD ve % RSD değerleri hesaplandı.

Günler arası kesinlik: Bir gün içinde yapılan kesinlik çalışmaları 2. ve 3. günlerde tekrarlandı.

3.2.5.4. Doğruluk

Elde edilen deney sonuçlarının gerçek değere veya kabul edilen bir referansa olan yakınlığıdır (ICH Tripartite Guideline Q2(R1) 2005).

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğu takrolimus yüklü dört mikroemülsiyon formülasyonu ile çalışıldı. Bunun için mikroemülsiyonların plasebo formülasyonları hazırlandı. Her bir plasebodan 0,5 g tartılarak 10 mL'lik balon jojelere aktarıldı. Üzerlerine 1000 µg/mL takrolimus stok çözeltisinden 1'er mL hacimde ilave edildi ve balon jojeler asetonitril ve su 70:30 (h:h) ile hacmine tamamlandı, vorteksle karıştırıldı. Böylece etkin madde+formülasyon içeren %100'lük konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlandı. Her bir çözelti şırınga ucu (0,45 µm, PTFE, Millex-LCR, Milipore) filtre ile süzülerek HPLC'de analiz edildi. Çalışma üç kez tekrarlandı. Doğru denklemi yardımıyla çözeltilerdeki takrolimus konsantrasyonu hesaplandı.

3.2.5.5. Seçicilik

Analitik yöntemin seçiciliği analiz edilecek maddeyi örnekte varlığı tespit edilmiş ve analiz edilecek madde ile girişim yapabilecek diğer bileşenlerden farklı olarak ölçme yeteneği olarak tanımlanır (Söğüt-Ertaş ve Kayalı 2005).

Bu amaca yönelik etkin madde içermeyen formülasyonlar asetonitril ve su 70:30 (h:h) ile ekstre edildikten sonra HPLC'de analiz edildi. Etkin madde takrolimusun pik verdiği alana girişim yapıp yapmadıkları saptandı.

3.2.5.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Analitik yöntemin en düşük derişimleri tespit edebilme kabiliyetidir. Değerlendirme, teşhis limiti (TL) ve miktar tayini limiti (MTL) olarak yapılır. Teşhis limiti (Dedection limit, DL) analiz edilecek maddenin analitik bir işlemle tayin edilebilecek en düşük miktarı veya konsantrasyonudur. Miktar tayini limiti (Quantification limit, QL) analiz edilecek maddenin analitik bir işlemle uygun doğruluk ve kesinlikle tayin edilebilecek en düşük konsantrasyonudur (ICH Tripartite Guideline Q2(R1) 2005).

TL ve MTL hesabı için 3 tane kalibrasyon doğrusunun eğimlerine ait standart sapma değerleri aşağıdaki denklemlere yerleştirildi.

$$TL = \frac{3{,}3\,\sigma}{S} \qquad \textbf{(3-1)}$$

$$MTL = \frac{10\,\sigma}{S} \qquad \textbf{(3-2)}$$

σ = Kalibrasyon doğrusunun eğimine ait standart sapma değeri

S= Ortalama kalibrasyon doğrusu eğimi

3.2.5.7. Stabilite

Hazırlanan örneklerin analizi süresince içlerindeki takrolimusun dayanaklı olduğundan emin olmak için stabilite çalışması yapıldı. Çalışmada örneklerin hazırlanma süresi ve analiz süresi için gereken süre dikkate alınarak örnekleme zamanları 0. 24. 48. ve 72. saat olarak belirlendi. Bu amaçla yöntem 3.2.5.1.'de belirtildiği gibi takrolimus stok ve ara stok çözeltileri hazırlandı. Bu ara stok çözeltiden 50 µg/mL konsantrasyonda standart çözeltiler hazırlandı.

3.2.6. Fusidik Asitin HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Çalışmaları

Kullanılan analitik yöntemin validasyonu için doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), deri ve bant örneklerinden etkin maddenin geri kazanımı (accuracy), seçicilik (specificity), teşhis limiti (detection limit), miktar tayini limiti (quantification limit) ve stabilite parametreleri çalışıldı.

3.2.6.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için 10 mg fusidik asit hassas olarak tartılıp balon joyeye alındı. Üzerine asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edildi, balon jojede vorteks ile karıştırılarak çözündürüldü. Hacim 10 mL'ye tamamlanarak 1000

µg/mL konsantrasyonda fusidik asit içeren stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak 10 mL'lik başka bir balon jojeye aktarıldı ve asetonitril ve su 70:30 (h:h) ile hacmine tamamlandı. Böylece, 100 µg/mL konsantrasyonda fusidik asit ara stok çözeltisi hazırlandı. Bu ara stok çözeltiden de asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile seri seyreltmeler yapılarak 25, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 ve 0,25 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Seyreltmelerin her basamağında standart çözeltiler önce vorteks ile karıştırıldı, sonra seyreltmeleri yapıldı. Seyreltmelerin homojen olması sağlandı.

3.2.6.2. Doğrusallık

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için yöntem 3.2.6.1.'de anlatıldığı gibi fusidik asit stok çözeltisi hazırlandı (1000 µg/mL). Bu stok çözeltiden 100 µg/mL konsantrasyonda ara stok çözeltisi ve seri seyreltmelerle 25, 10, 5, 2,5, 1, 0,5 ve 0,25 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler asetonitril ve su 70:30 (h:h) ile hazırlandı. 7 farklı konsantrasyonun 3 ayrı enjeksiyon ile elde edilen pik alanları hesaplanarak standart eğri çizildi. Doğru denklemi, r^2, SD ile RSD değerleri hesaplandı.

3.2.6.3. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliğinin tayini için yöntem 3.2.6.1.'deki gibi fusidik asit stok ve ara stok çözeltileri hazırlandı. Ara stok çözeltiden 5, 2,5 ve 1 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Gün içi kesinlik ile günler arası kesinlik yöntem 3.2.5.3.'te kesinlik bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı.

3.2.6.4. Deriden ve Banttan Fusidik asidin Geri Kazanımı (Doğruluk)

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarında deri numunelerinden bantla soyma işlemiyle uzaklaştırılan fusidik asit miktarını saptamak için bilinen konsantrasyonlar kullanılarak ekstraksiyon yönteminin doğruluğu çalışıldı. Bu amaçla tüm kalınlıkta domuz derilerinin ve bantların (Scotch 3M Book Tape 3 M, 845) üzerlerine bilinen konsantrasyonda fusidik asitin aseton içindeki çözeltisinden eklendi (25 µg/mL ve 125 µg/mL, n=3). Deri ile bant örnekleri çeker ocakta bekletilerek aseton uçuruldu ve örnekler 10'ar mL asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile 18 saat oda sıcaklığında ekstrakte edildi. Deri ve bant ekstraktları şırınga ucu (0,45 µm, PTFE, Millex-LCR, Milipore) filtre ile süzülerek HPLC şişelerine alındı ve HPLC'de analiz edildi.

Analitik yöntemin doğruluğu çalışılırken kullanılan deri ve bant örnekleri penetrasyon çalışmasında kullanılan Franz difüzyon hücrelerinin alanlarına (4,91 cm^2) yakın olacak şekilde (2,3 x2,3=5,29 cm^2) kesildi. Böylece, deri ve bant üzerindeki bilinen fusidik asit konsantrasyonları µg/cm^2 olarak hesaplandı.

3.2.6.5. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği için, yöntemde kullanılan domuz derisi ve yapışkan bant asetonitril ve su 70:30 (h:h) ile ekstre edildikten sonra HPLC'de analiz edildi. Örneklerin fusidik asitin pik verdiği alana girişim yapıp yapmadıkları saptandı.

3.2.6.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

TL ve MTL hesabı için 3 tane kalibrasyon doğrusunun eğimlerine ait standart sapma değerleri 3.2.5.6.'da belirtilen denklemler ile hesaplandı.

3.2.6.7. Stabilite

Penetrasyon çalışması ve analiz süresince numunelerdeki fusidik asitin dayanıklı olduğundan emin olmak için stabilite çalışması yapıldı. Bu amaçla yöntem 3.2.6.1.'deki gibi fusidik asit stok ve ara stok çözeltileri hazırlandı. Ara stok çözeltiden 25 µg/mL konsantrasyonda örnek çözeltiler hazırlandı. 0. 24. 48. 72. saatlerde HPLC kolonuna enjekte edildi. Elde edilen pik alanları kullanılarak fusidik asit konsantrasyonunda değişiklik olup olmadığı ve farklı bir pik oluşup oluşmadığı saptandı.

3.2.7. Fusidik Asitin *In Vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Çalışmaları

Kullanılan analitik yöntemin validasyonu için doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk/geri kazanım (accuracy), seçicilik (specificity), teşhis limiti (detection limit), miktar tayini limiti (quantification limit) ve stabilite parametreleri çalışıldı.

3.2.7.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

In vitro salım çalışmasında sonsuz seyrelme koşulunu sağlamak için pH 7,4 PBS ve etanol 70:30 (h:h) çözeltisi kullanıldı. Bu çözelti, reseptör faz olarak isimlendirildi ve standart çözeltilerin hazırlanmasında kullanıldı.

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için 10 mg fusidik asit hassas olarak tartılıp balon joyeye alındı. Üzerine asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edildi, balon

jojede vorteks ile karıştırılarak çözündürüldü. Hacim 10 mL'ye tamamlanarak 1000 µg/mL konsantrasyonda fusidik asit içeren stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak eppendorf tübe aktarıldı, üzerine 1000 µL reseptör faz çözeltisi ilave edilerek 2 mL'ye seyreltildi ve 500 µg/mL konsantrasyonda ara stok çözeltisi hazırlandı. 500 µg/mL konsantrasyondaki ara stok çözeltiden seri seyreltmeler yapılarak sırasıyla 1000, 800, 1000, 1000, 800, 1000 µL alındı ve her biri reseptör faz ile PBS: Etanol 70:30 (h:h) 2 mL'ye seyreltildi. Böylece sırasıyla 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Seyreltmelerin her basamağında standart çözeltiler önce vorteks ile karıştırıldı, sonra seyreltmeleri yapıldı.

3.2.7.2. Doğrusallık

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için yöntem 3.2.7.1.'de anlatıldığı gibi fusidik asit stok çözeltisi ve ara stok çözelsitisi hazırlandı. Bu ara stok çözeltiden seri seyreltmeler yapılarak 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan standart çözeltiler HPLC'ye enjekte edildi. 6 farklı konsantrasyonun (250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL) 3 ayrı enjeksiyon ile elde edilen pik alanları hesaplandı, standart eğri çizildi. Doğru denklemi, r^2, SD ile RSD değerleri hesaplandı.

3.2.7.3. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinliğinin tayini için yöntem 3.2.7.1.'de belirtildiği gibi fusidik asit stok ve ara stok çözeltileri hazırlandı. Ara stok çözeltiden 5, 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Gün içi kesinlik ile günler arası kesinlik yöntem 3.2.5.3.'te Kesinlik bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı.

3.2.7.4. Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğu için *in vitro* salım çalışmasında salım özellikleri araştırılan çözücüsü Propilen karbonat olan ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu, katı parafin içeren takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem formülasyonunun plasebosu yöntem 3.2.5.4. anlatıldığı şekilde hazırlandı. Plasebodan 0,5 g tartılarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Üzerine 1000 µg/mL fusidik stok çözeltisinden 1 mL hacimde ilave edildi ve balon joje reseptör faz ile hacmine tamamlandı, vorteksle karıştırıldı. Etkin madde+formülasyon içeren %100'lük konsantrasyondaki çözelti şırınga ucu (0,45 µm, PTFE, Millex-LCR, Milipore) filtre ile

süzülerek HPLC'de analiz edildi. Çalışma üç kez tekrarlandı. Doğru denklemi yardımıyla çözeltilerdeki fusidik asit konsantrasyonu hesaplandı.

3.2.7.5. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği için etkin maddeleri içermeyen formülasyon reseptör fazla ekstre edildikten sonra HPLC'de analiz edildi. Etkin madde fusidik asidin pik verdiği alana girişim yapıp yapmağı saptandı.

3.2.7.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

TL ve MTL hesabı için 3 tane kalibrasyon doğrusunun eğimlerine ait standart sapma değerleri 3.2.5.6.'da belirtilen denklemler ile hesaplandı.

3.2.7.7. Stabilite

In vitro salım çalışması süresince numunelerdeki fusidik asitin dayanıklı olduğundan emin olmak için stabilite çalışması yapıldı. Bu amaçla 3.2.7.1.'de anlatıldığı gibi fusidik asit stok çözeltisi hazırlandı (1000 µg/mL). Bu stok çözeltiden reseptör fazla seyreltme yapılarak 10 µg/mL konsantrasyonda örnek çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltiler 0. 2. 4. 6. 8. 24. ve 48. saatlerde HPLC kolonuna enjekte edildi. Elde edilen pik alanları kullanılarak, 48 saat süre ile fusidik asit konsantrasyonunda değişiklik olup olmadığı ve farklı bir pik oluşup oluşmadığı saptandı.

3.2.8. Takrolimusun Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

Sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC-MS) HPLC yönteminin kütle spektrometrisi yöntemi ile kombinasyonudur. Ayrımı tam gerçekleşmemiş analitler için daha kesin bir teşhis ve kantitatif tayin imkanı sağlamaktadır. Bu yöntemde HPLC ile fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle detektörü ile analiz edilmektedir (Anılmert 2014 p.63).

Takrolimus içeren formülasyonların *in vitro* salım çalışması ile *in vitro* deriden penetrasyon çalışması örneklerinin analizinde LC-MS yöntemi kullanıldı. Söz konusu çalışmalar için litaratürde takrolimus için kayıtlı (Goebel ve ark. 2011) LC-MS yöntemi bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Hem *in vitro* salım hem de *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında elektrospray voltajı artırıldı. *In vitro* salım çalışması için hareketli fazdaki formik asit yüzdesi artırıldı. *In vitro* deriden penetrasyon çalışması için ise enjeksiyon hacmi artırıldı.

3.2.8.1. Analiz Çalışma Koşulları

Analizlerde 50 x 3 mm boyutlarında 2,7 µm partikül büyüklüğüne sahip C_{18} kolon kullanıldı. Penetrasyon çalışmalarına ait örneklerdeki deriden gelen kirlilikleri önlemek için ayrıca 10 x 2,1 mm, 3 µm partikül büyüklüğüne sahip C_{18} ön (koruyucu) kolonu kullanıldı. Kolon sıcaklığı 60°C sıcaklığa ayarlandı. Sistemin akış hızı 0,2 mL/dk. olarak uygulandı.

Kütle spektrometrik dedeksiyonu elektrospray iyonizasyon ile pozitif modda yapıldı. Elektrospray voltajı 5000 V ve fragmantor voltaj 250 V olarak; elektrospray iyonizasyonun gaz sıcaklığı 250°C ve gaz akışı 10 L/dk olarak çalışıldı. İnternal standart olarak Agilent marka 2,5 mM HP-0921 kodlu çözelti kullanıldı. Bu çözelti asetonitril:su karışımında (90:10; h:h) 2,5 mM hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine' den oluşmaktadır. Söz konusu çözeltide yer alan ve analizde düzeltme için kullanılan kütleler 122 ve 922'dir.

3.2.8.2. Hareketli Fazın Hazırlanması

In vitro salım çalışması ile *in vitro* deriden penetrasyon çalışması için analizlerde kullanılacak hareketli faz, A hareketli fazı ve B hareketli fazı olarak 35:65 (h:h) oranında hazırlandı ve gradient koşulda çalışıldı. *In vitro* deriden penetrasyon çalışmasında A hareketli fazı %0,005'lik formik asit çözeltisi olarak hazırlandı. *In vitro* salım çalışması için ise A hareketli fazındaki formik asit çözeltisinin yüzdesi artırıldı. Her iki çalışma için B hareketli fazı %100 asetonitril olarak kullanıldı.

3.2.9. Takrolimusun *In vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Kullanılan analitik yöntemin validasyonu için doğrusallık (linearity), teşhis limiti (detection limit), miktar tayini limiti (quantification limit) parametreleri çalışıldı.

3.2.9.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

In vitro salım çalışmasında sonsuz seyrelme koşulunu sağlamak için yöntem 3.2.7.1'de olduğu gibi izotonik pH 7,4 PBS ve etanol karışımı (70:30; h:h) reseptör faz olarak kullanıldı. Standart çözeltilerde aynı reseptör faz çözücü sistemi ile seyreltilerek hazırlandı.

Miktar tayini yönteminin validasyonu için 10 mg takrolimus hassas olarak tartılıp balon joyeye alındı. Üzerine asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edildi, balon

jojede vorteks ile karıştırılarak çözündürüldü. Hacim 10 mL'ye tamamlanarak 1000 µg/mL konsantrasyonda takrolimus içeren stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak eppendorf tübe aktarıldı, üzerine 1000 µL reseptör faz ilave edilerek 2 mL'ye seyreltildi ve 500 µg/mL konsantrasyonda 1. Ara stok çözeltisi hazırlandı. 1. Ara stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine reseptör faz ile tamamlandı. Böylece 50 µg/mL konsantrasyonda 2. Ara stok çözeltisi hazırlandı. 2. Ara stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak 10 mL'lik balon jojede hacmine reseptör faz ile tamamlanarak 5 µg/mL (5000 ng/mL) konsantrasyonda 3. Ara stok çözeltisi hazırlandı. Bu ara stok çözeltiden 1000, 800, 1000, 1000, 800, 1000 1000 800 1000 µL alındı ve her biri reseptör faz ile 2 mL'ye seyreltildi. Seri seyreltmelerle 2500, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 ng/mL konsatrasyonlarındaki standart çözeltiler hazırlandı.

3.2.9.2. Doğrusallık

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için yöntem 3.2.9.1.'de anlatıldığı gibi takrolimus stok ve ara stokçözeltileri ile standart çözeltileri hazırlandı. Standart çözeltiler LC-MS'te analiz edildi. Doğru denklemi, r^2, SD ile RSD değerleri hesaplandı.

3.2.9.3. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

TL ve MTL hesabı için 3 tane kalibrasyon doğrusunun eğimlerine ait standart sapma değerleri 3.2.5.6.'da belirtilen denklemler ile hesaplandı.

3.2.10. Takrolimusun *In vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Kullanılan analitik yöntemin validasyonu için doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), deri ve bant örneklerinden etkin maddenin geri kazanımı (accuracy), seçicilik (specificity), teşhis limiti (detection limit), miktar tayini limiti (quantification limit) parametreleri çalışıldı.

3.2.10.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

Miktar tayini yönteminin validasyonu için 10 mg takrolimus hassas olarak tartılıp balon joyeye alındı. Üzerine asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edildi, balon jojede vorteks ile karıştırılarak çözündürüldü. Hacim 10 mL'ye tamamlanarak 1000 µg/mL konsantrasyonda takrolimus içeren stok çözelti hazırlandı. Bu stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak eppendorf tübe aktarıldı, üzerine 1000 µL asetonitril ve

su karışımı (70:30; h:h) ilave edilerek 2 mL'ye seyreltildi ve 500 µg/mL konsantrasyonda 1. Ara stok çözeltisi hazırlandı. 1. Ara stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine çözücü ile tamamlandı. Böylece 50 µg/mL konsantrasyonda 2. Ara stok çözeltisi hazırlandı. 2. Ara stok çözeltiden 1000 µL mikropipetle alınarak, 10 mL'lik balon jojede hacmine çözücü ile tamamlandı ve 5 µg/mL (5000 ng/mL) konsantrasyonda 3. Ara stok çözeltisi hazırlandı. Bu ara stok çözeltiden 1000, 800, 1000, 1000, 800, 1000 1000 800 1000 µL alındı ve her biri asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile 2 mL'ye seyreltildi. Seri seyreltmelerle 2500, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 ng/mL konsatrasyonlarındaki standart çözeltiler hazırlandı.

3.2.10.2. Doğrusallık

Miktar tayini yönteminin doğrusallığı için yöntem 3.2.10.1.'de anlatıldığı gibi takrolimus stok ve ara stok çözeltileri ile standart çözeltileri hazırlandı. Standart çözeltiler LC-MS'te analiz edildi. Doğru denklemi, r^2, SD ile RSD değerleri hesaplandı.

3.2.10.3. Kesinlik

Analitik yöntemin kesinlik tayini için yöntem 3.2.10.1.'de anlatıldığı gibi takrolimus stok ve ara stokçözeltileri hazırlandı. 3. Ara stok çözeltiden 1000, 250, 25 ng/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Gün içi kesinlik ile günler arası kesinlik yöntem 3.2.5.3.'te Kesinlik bölümünde anlatıldığı gibi çalışıldı.

3.2.10.4. Deriden ve Banttan takrolimusun Geri Kazanımı (Doğruluk)

Penetrasyon çalışmasında deri numunelerinden bantla soyma işlemiyle uzaklaştırılan takrolimus miktarını saptamak için, etkin maddedin deri örneklerinden ekstraksiyonu için uygulanan yönteminin doğruluğu çalışıldı. Bu amaçla, tam kalınlıkta domuz derilerinin ve bantların (Scotch 3M Book Tape 3 M, 845) üzerlerine takrolimusun asetondaki çözeltisinden iki farklı konsantrasyonda (50 ng/mL ve 250 ng/mL, n=3) olacak şekilde eklendi. Etkin madde ilave edilerek hazırlanan deri ve bant örnekleri çeker ocakta bekletilerek örneklerdeki aseton uçuruldu. Üzerlerine 7'şer mL asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) eklendi ve 18 saat oda sıcaklığında ekstrakte edildi. Deri ve bant ekstraktları şırınga ucu (0,45 µm, PTFE, Millex-LCR, Milipore) filtre ile süzülerek LC-MS'te analiz edildi.

Analitik yöntemin doğruluğu çalışılırken yöntem 3.2.6.4.'te belirtildiği gibi kullanılan deri ve bant örnekleri 2,3 x2,3=5,29 cm^2 boyutlarında kesildi. Böylece, deri ve bant üzerindeki bilinen takrolimus konsantrasyonları ng/cm^2 olarak hesaplandı.

3.2.10.5. Seçicilik

Yöntemin seçiciliği için deri ve bant asetonitril ve su 70:30 (h:h) ile ekstre edilerek LC-MS'te analiz edildi. Örneklerin takrolimusun pik verdiği alana girişim yapıp yapmadıkları saptandı.

3.2.10.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

TL ve MTL hesabı için 3 tane kalibrasyon doğrusunun eğimlerine ait standart sapma değerleri 3.2.5.6.'da belirtilen denklemler ile hesaplandı.

3.2.11. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyon Çalışmaları

Mikroemülsiyonlara etkin madde yüklemesinin farklı yöntemlerle yapılmaktadır. Etkin madde, yağ:sürfaktan:kosürfaktan içinde çözündürülür ve su ile titre edilir (Chen ve ark. 2006). Etkin madde, sürfaktan:kosürfaktan karışımında çözündürülür, sonra yağ fazı eklenip su ile titre edilebilir (Hathout ve Elshafeey 2012). Önce, yağ:sürfaktan:kosürfaktan karışımı su ile titre edilir ve boş mikroemülsiyon hazırlanır, sonra etkin madde eklenir ve çözünmesi sağlanır (Zhu ve ark. 2008). Her yöntemde sistemin dengeye gelmesi beklenir.

Ön formülasyon çalışmaları ile Yöntem 3.2.2.2.'de belirtilen özellliklere göre seçilen mikroemülsiyonlara takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin yüklemesi yapıldı. Bu amaçla yağ:sürfaktan:kosürfaktan karışımına etkin maddeler ilave edilerek çözündürüldü. Yöntem 3.2.2.'de belirtildiği gibi üzerine su ilave edilerek mikroemülsiyonlar oluşturuldu. Karıştırma işlemi oda sıcaklığında 720 rpm hızla, 12-18 saat süreyle manyetik karıştıcı (IKA-Werke, RT 15) kullanılarak gerçekleştirildi.

Etkin maddeler takrolimus (USP 36, 2013) ve fusidik asitin (Avrupa farmakopesi, EP 8.0, 2012) moleküler yapılarında oksidasyona açık grupların olması nedeniyle mikroemülsiyonlara antioksidan madde mikroorganizma üremesine karşı da antimikrobiyal koruyucu madde eklenmesine karar verildi. Bu amaçla, eklenecek bu yardımcı maddelerin etkinliğini araştırmak ve formülasyon içindeki oranlarını belirlemek için kısa süreli 40±2˚C sıcaklık %75±5 bağıl nem koşulunda stabilite çalışmaları yapıldı.

Optimizasyon çalışmaları için; ön formülasyon çalışmaları verilerine göre; sürfaktan miktarı daha az ve su oranı miktarı daha fazla olan yağ fazı Capryol 90, sürfaktanı Labrasol, kosürfaktanı Transcutol P olan S:KoS oranı 1:2 olan mikroemülsiyon formülasyonu [CLT(1:2)] seçildi. Seçilen antioksidan madde/ler ve antimikrobiyal koruyucu madde yağ:sürfaktan:kosürfaktan karışımına eklenerek mikroemülsiyonlar yukarıda belirtildiği şekilde su ile titrasyon yöntemi ile hazırlandı. Karıştırma için mekanik bir karıştırıcı (Heidolp RZR 20151 Control) kullanıldı. Hazırlanan her mikroemülsiyonun stabilitesi 3 ay süreyle 40±2˚C, %75±5 koşulunda izlendi. Stabilite çalışmaları kapsamında mikroemülsiyon formülasyonundaki etkin maddelerin miktar tayini ve safsızlık çalışmaları yapıldı. Fiziksel stabiliteleri için de pH ile damlacık boyutu ve dağılımı değerlendirildi.

İlk olarak mikroemülsiyon formülasyonuna topikal formülasyonlarda kullanılabilen yardımcı maddelerden antioksidan madde olarak butil hidroksi anisol (BHA) (Rowe ve ark. 2009 p.73) ve antimikrobiyal koruyucu madde olarak benzoik asit (Rowe ve ark. 2009 p.61) eklendi. Mikroemülsiyon "CLT (1:2)-A" olarak kodlandı. Antimikrobiyal koruyucu madde seçimi mikroemülsiyon formülasyonunun pH değeri dikkate alınarak yapıldı. Literatürde takrolimusun yüksek pH değerlerinde düşük oranlarda çözündüğü ve bunun nedeninin etkin maddenin stabilitesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Goebel ve ark. 2011). Dolayısıyla optimum aktivitesini pH ≤ 4,5 değerinde gösterebilen benzoik asit antimikrobiyal koruyucu madde olarak (Rowe ve ark. 2009 p.61) seçildi.

İkinci olarak; mikroemülsiyon formülasyonundaki BHA miktarı artırıldı. Ayrıca topikal preparatlarda içeriğinde su olan formulasyonlara ilave edilebilen şelat yapıcı madde olarak disodyum etilendiamin tetraasetik asit (Rowe ve ark. 2009 p.243) eklendi. Mikroemülsiyon "CLT (1:2)-B" olarak kodlandı.

Son olarak mikroemülsiyon formülasyonuna BHA dışında antioksidanlar eklenerek ve formülasyondaki antioksidan miktarı artırılarak devam edildi. Bu kapsamda topikal preparatlarda kullanıldığı bilinen butil hidroksi toluen (BHT) (Rowe ve ark. 2009 p.75) ve Vitamin E (Rowe ve ark. 2009 p.31) formülasyon bileşimine eklendi.

Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda; mikroemülsiyon formülasyonunda etkin maddelerin stabil kalabilmesi için gerekli antioksidan, koruyucu ve şelat yapıcı maddeler ile bu maddelerin oranları belirlendi. Bu veriler dikkate alınarak, takrolimus ve fusidik

asit etkin maddelerini bir arada içeren bütün mikroemülsiyonlara belirlenen oranlarda bu yardımcı maddeler eklenerek, mikroemülsiyon formülasyonlarının optimizasyonu yapıldı. Söz konusu mikroemülsiyonların formülasyon kodları korundu ve "CLT (1:1)" "CLT (2:1)" ve "CLT (1:2)" kodları etkin maddeler yüklü, antioksidan ve koruyucu madddeleri içeren mikroemülsiyonlar için de kullanıldı.

3.2.12. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyon Çalışmaları

Ön formülasyonlar çalışmaları ile yöntem 3.2.2.2.'de belirtilen özellliklere göre seçilen mikroemülsiyonlara sadece takrolimus yüklemesi yapıldı. Takrolimus yüklü mikroemülsiyonlara, Yöntem 3.2.11.'de yapılan çalışmalar ile seçilen ve miktarları saptanan antioksidan ve koruyucu maddeler ilave edildi. Söz konusu mikroemülsiyonların formülasyon kodları korundu ve "OLT-CEL" "OLT", "OTT-PEG" ve "OTT" kodları etkin madde yüklü, antioksidan ve koruyucu maddeleri içeren mikroemülsiyonlar için de kullanıldı.

3.2.13. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Merhemlerin Optimizasyon Çalışmaları

Formülasyonlar hazırlanırken oda sıcaklığında katı olan sıvağlar eritildi. Etkin madde takrolimus çözücü veya çözücüler içinde oda sıcaklığında ya da ısı kullanılarak çözündürüldü. Etkin madde fusidik asit eriyik sıvağda sıcaklık kontrolu yapıldıktan sonra (<40ºC) dağıtıldı. Bunun nedeni fusidik asitin ısı hassasiyetinin olmasıdır (Fusidik asit İlaç Ana Dosyası 2011). Daha sonra yağ fazlı iki karışım oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı (Heidolp RZR 20151 Control) ile karıştırıldı ve homojen olması sağlandı.

Çözücü fazı Capryol 90 ile Transcutol P olan ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu kullanılarak hazırlanan merhemlerden, formülasyon kodu "MR-TC-5" olan merhem etkin maddeler yüklenerek hazırlandı. Merhem fomülasyonunun stabilitesi 3 ay süreyle 40±2˚C sıcaklık, %75±5 bağıl nem koşulunda izlendi. Stabilite çalışmaları kapsamında formülasyonlarda etkin maddelerin miktar tayini ve safsızlık çalışmaları yapıldı. Fiziksel stabiliteleri için de formülasyonların pH'sı değerlendirildi.

Daha sonra etkin maddelerin oksidasyona açık gruplar taşıması (EP 8.0, 2012; USP 36, 2013) bilgisi dikkate alınarak formülasyon bileşimlerine antioksidan (BHA) ilave edildi. MR-TC-5 formülasyonunun yüksek sıcaklık değerlerindeki fiziksel stabilitesini artırmak için formülasyona katı parafin eklendi. Ayrıca takrolimusun çözündürme basamağında uygulanan işlem değiştirilerek hazırlama yöntemi de optimize

edildi. Sıvağda yer alan yardımcı maddelerden sıvı parafin miktarı artılırken (%5-15 yerine %15-25) vazelin miktarı azaltıldı (%60-70 yerine %25-35). Bu doğrultuda çözücüsü Transcutol P ile Capryol 90 olan BHA ve katı parafin ekli (%10-20), takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem formülasyonu hazırlandı ve MR-CT-8 olarak kodlandı.

Aynı zamanda çözücüsü Triasetin olan ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu ve katı parafin içeren formülasyonu kodu "MR-TA-5" olan merhem formülasyonu, etkin maddeler yüklenerek ve BHA eklenerek hazırlandı.

MR-TC-8 ve MR-TA-5 kodlu merhem fomülasyonlarının stabilitesi 40±2˚C sıcaklık, %75±5 bağıl nem koşulunda 1 ay süreyle izlendi.

Formülasyon optimizasyon çalışmalarına formülasyona farklı antioksidanlar (BHT ve Vitamin E) eklenerek ve formülasyondaki miktarları (BHA) artırılarak ayrıca formülasyon bileşenlerinin yüzde miktarları ayarlanarak devam edildi.

Bu kapsamda MR-TC-8 formülasyon bileşenlerinin miktarları dikkate alınarak çözücü fazı Capryol 90 ile Transcutol P olan ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu (%5-15 yerine %4-10), katı parafin içeren, BHA, BHT ve Vitamin E eklenen, takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem formülasyonu hazırlandı ve "MR-TC-9" olarak kodlandı.

Aynı zamanda çözücüsü Propilen karbonat olan ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu ve katı parafin içeren formülasyon kodu MR-PC-5 merhem formülasyonunda sıvağda yer alan sıvı parafin miktarı artırıldı (%40-50 yerine %45-55) ve katı parafin miktarı azaltıldı (%10-20 yerine %5-15). Merhem formülasyonu etkin maddeler yüklenerek ve BHA, BHT ve Vitamin E eklenerek yeniden hazırlandı ve "MR-PC-6" olarak kodlandı.

Optimizasyon çalışmaları MR-TC-9 ve MR-PC-6 merhem formülasyonları ile yürütüldü. Söz konusu formülasyonların stabilitelerinin 6 ay süreyle 2-8°C sıcaklık 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nem, 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nem koşullarında kapsamlı bir şekilde izlenip değerlendirilmesine karar verildi.

3.2.14. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Karakterizasyon Çalışmaları

Optimizyonu yapılan mikroemüsiyonların fiziksel görünüşü, refraktif indeksi, pH'sı, iletkenliği, damlacık boyutu, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli,

viskozitesi ve fiziksel stabilitesi değerlendirildi. Polarize ışık mikroskop ile incelendi ve hacim fraksiyonları hesaplandı.

3.2.14.1. Fiziksel Görünüş

Mikroemülsiyon formülasyonları fiziksel görünüş, homojenite ve renk özellikleri açısından oda sıcaklığında değerlendirildi.

3.2.14.2. Refraktif İndeks

Mikroemülsiyonların refraktif indeks (RI) değerleri Abbe 5 refraktometresi ile oda sıcaklığında ölçüldü. Refraktometre prizmasının üzerine birkaç damla formülasyon damlatıldı ve kapağı kapatıldı. Görüntü netliği için yan kol kullanıldı.

Refraktometre cihazının göz merceğinde, görüntüyü ikiye bölen bir çizgi bulunur; ölçme yapılırken aydınlık ve karanlık ara yüzeyi mercekteki çizgi ile üst üste gelinceye kadar prizma açısı döndürülür. Bu durumdaki prizmanın konumu sabit skaladan saptanır (Refraktometri, Ref. E_makaleleri, Erişim tarihi 14.10.2016). Bu ölçüm esasına dayanarak formülasyonların RI değerler kaydedildi, öçümler her formülasyon için 3 kez tekrarlanarak aritmetik ortalama ve SD değerleri saptandı. Ölçümler öncesi cihaz ultra saf su (RI: 1,333) ile kalibre edildi.

3.2.14.3. pH

Mikroemülsiyonların pH ölçümleri oda sıcaklığında her formülasyon için 3 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi, ölçümlerin aritmetik ortalama ve SD değerleri saptandı. Ölçümlerin öncesinde pH 4, 7 ve 10 standartları kulanılarak cihazın kalibrasyonu yapıldı.

3.2.14.4. İletkenlik

Mikroemülsiyonların iletkenlik ölçümleri oda sıcaklığında her formülasyon için 3 kez tekranarak gerçekleştirildi, ölçümlerin aritmetik ortalama ve SD değerleri saptandı. Ölçümlerin öncesinde 1423 µS iletkenlik değerindeki kalibrasyon çözeltisi kullanılarak cihaz kalibre edildi.

Mikroemülsiyon formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları kapsamında yağ fazına eklenen su fazı ile değişen iletkenliği değerlendirmek için % 0,9 NaCI çözeltisi hazırlandı (Zhang ve Michniak-Kohn 2011). Bu çözelti her mikroemülsiyonun yağ:sürfaktan:kosürfaktan karışımına % 5 oranında eklendi. Ekleme sonrası manyetik karıştırıcı üzerinde sistemin dengeye gelmesi için beklendi ve sonra eklenen su fazı

miktarı kaydedildi. Sistemin iletkenliği su fazı %0 iken ve her %5'lik su fazı eklendikten sonra 3 defa ölçüdü. Su fazına bağlı değişen iletkenlik ölçümleri grafik ile değerlendirildi.

3.2.14.5. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi

Mikroemülsiyonların damlacık boyutu (PS) ve polidispersite indeksleri (PDI) dinamik ışık saçılımı esasına dayanan Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanılarak ölçüldü. Ölçüm öncesi mikroemülsiyonlar 0,45 µm Millex-LCR (PTFE) şırınga ucu filtre ile süzüldü ve dengeye gelmeleri için 10 dakika beklendi. 25°C'de 173°C açıda 10 saniye süreli 11 taramayla 3 kez tekrarlanarak ölçümler yapıldı. Ölçümlerin aritmetik ortalama ve SD değerleri saptandı.

3.2.14.6. Zeta Potansiyeli

Formülasyonların zeta potansiyel değerlerinin ölçümleri Malvern Zetasizer Nano-ZS cihazı kullanlarak, 25°C'de 20 taramayla 3 kez tekrarlanarak yapıldı. Ölçümlerin aritmetik ortalama ve SD değerleri saptandı.

3.2.14.7. Viskozite

Mikroemülsiyonların akış özellikleri araştırmak için viskoziteleri oda sıcaklığında Brookfield viskozimetresinde SC4-18 mil (spindle) ile 50 rpm' de çalışılarak ölçüldü.

3.2.14.8. Fiziksel Stabilite

Mikroemülsiyonlar 5000 rpm hızda 15 dk. Santrifüj (Nüve NF 415) edildi. İşlem sonrası mikroemülsiyonlarda faz ayrımı olup olmadığı görsel olarak değerlendirildi. Ayrıca, dondurma-çözme döngüsünün üç defa tekrarlanmasıyla mikroemülsiyonlar 24 saat oda sıcaklığında [22-25°C] ve 24 saat derin dondurucuda [-18°C] bekletildi. Bu çalışmada da formülasyonlar homojenite, faz ayrımı ve bulanıklık açısından görsel olarak incelendi.

3.2.14.9. Polarize Işık Mikroskobu

İzotropik yapı gösteren ve bunun sonucu olarak uzayda belirli bir yönelim göstermeyen mikroemülsiyonlar, polarize ışık mikroskobu ile incelenerek karanlık görüntü elde edildi. Ölçüm öncesi formülasyonlar damlalık yardımıyla lama damlatıldı ve çapraz polarize ışık altında Leica 5x Pol mercek ile incelendi.

3.2.14.10. Hacim Fraksiyonunun Belirlenmesi

Karakterizasyonları, yapılan ölçümlerle tayin edilebilen mikroemülsiyonların hacim fraksiyonlarının hesaplamayla bulunabilir (Shukla ve ark. 2003b). Seçilen formülasyonlarda sürfaktan ve yağ fazının toplamı formülasyonda yer alan bütün bileşenlerin toplamına oranlanmasıyla her bir formülasyon için hacim fraksiyonu bulundu**.**

3.2.15. Mikroemülsiyonlardan Etkin Maddelerin *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmaları

Derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asit miktarlarını saptamak için tam kalınlıkta domuz derisi kullanılarak *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları yapıldı. Çalışmada kullanılan deriler, kullanılacakları zamana kadar -20°C'de muhafaza edildi. Çalışma öncesi ise derin dondurucudan çıkartılarak oda sıcaklığında bir süre bekletildi, daha sonra üzerlerindeki kıllar makas yardımıyla kesildi, alttaki yağlı tabaka (*hipodermis*) deriye zarar vermeyecek şekilde neşter yardımıyla uzaklaştırıldı. Bütün deri örnekleri çalışmada kullanılan PermeGear Franz tipi difüzyon hücrelerinin (14 mL hacim ve etkin difüzyon alanı 4,91 cm^2) boyutunda kesilerek reseptör faz içinde bekletildi. Reseptör faz olarak izotonik haldeki pH 7,4 PBS çözeltisi kullanıldı. PBS çözeltisi ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra hücrelere dolduruldu ve her bir hücreye birer magnet konuldu. Domuz derileri, *stratum corneum'*da ve kısmı üstte kalacak şekilde Franz difüzyon hücrelerine reseptör ve donör kompartmanlar arasına yerleştirildi. Hücrelerin üzerinde hava boşluğu olup olmadığı kontrol edildi. Su banyosu 37°C'de sabitlendi.

Çalışmada, geliştirilen takrolimus ve fusidik asit içeren mikroemülsiyonlar [CLT (1:1), CLT (2:1) ve CLT (1:2)] ile sadece takrolimus içeren mikroemülsiyonların (OLT-CEL, OLT, OTT ve OTT-PEG) *in vitro* koşullarda deriden penetrasyonu, pazarda bulunan takrolimus (Protopic® merhem) ve fusidik asit (Fucidin® krem) içeren ticari ürünler ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Formülasyonların uygulama miktarları 1 gram ve ya 1000 µL belirlendi (cm^2'ye 0,204 gram veya 0,204 µL). Her bir formülasyon için en az 6 hücre çalışıldı. 12 saatlik uygulama süresi sonunda reseptör fazdan bir defa örnek alındı ve takrolimusun ile fusidik asidin deriden geçişlerinin değerlendirilmesinde kullanıldı.

Uygulama süresinin sonunda Franz difüzyon hücrelerinden alınan derilerin üzerinde kalan formülasyon fazlası kağıt peçete yardımıyla uzaklaştırıldı. Etkin

maddelerin *stratum corneum*'da ve derinin daha derin tabakalarındaki birikimlerini saptamak için derilere ardışık olarak 20 kez yapışkan bant (Scotch 3M Book Tape 3M, 3.8x4 cm) belirli bir basınçta uygulanarak bantla soyma işlemi gerçekleştirildi. Bantlar 5'erli gruplar halinde toplanarak tüplere alındı. Canlı *epidermis+dermis* ise ayrı olarak tüplere alındı. Tüm örnekler 10'ar mL asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile 18 saat orbital karıştırıcıda karıştırıldı. Ektraksiyon işlemi öncesi ve sonrasında tüpler 2'şer dakika vortekslendi. Hem bantlardaki etkin maddelerin miktarları hem derilerdeki etkin maddelerin miktarları analiz edildi. Takrolimus etkin maddesinin deri ve bant örneklerindeki miktar tayini için LC-MS analizi; fusidik asit etkin maddesi içinse HPLC analizi yapıldı.

In vitro deriden penetrasyon çalışmalarında her iki etkin maddenin de ışık hassasiyeti olduğundan çalışma süresince ışık koruması sağlandı.

3.2.16. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların ATR-FTIR (Azaltılmış Toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmaları

ATR-FTIR çalışmalarında, domuz derisinin dorsal bölgesi dermatom (Zimmer™ Electrical Dermatom) edilerek kullanıldı. 750 µm kalınlığındaki kesitler çalışma öncesi reseptör faz içinde (pH 7,4 PBS) bekletildi. Çalışmada deri kesitleri, Franz tipi difüzyon hücrelerinin (12 mL hacim ve etkin difüzyon alanı 1,77 cm^2) boyutunda kesilerek reseptör ve donör kompartmanlar arasına yerleştirildi. Su banyosu 37°C'ye sabitlendi.

Çalışmada, geliştirilen takrolimus ve fusidik asit içeren mikroemülsiyonlar [CLT (1:1), CLT (2:1) ve CLT (1:2)] ile sadece takrolimus içeren mikroemülsiyonların (OLT-CEL, OLT, OTT ve OTT-PEG) *in vitro* koşullarda deriden penetrasyonu, pazarda bulunan takrolimus (Protopic® merhem) ve fusidik asit (Fucidin® krem) içeren ticari ürünler ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Formülasyon miktarları hücrelerdeki difüzyon alanına göre 0,36 gram veya 360 µL belirlendi (cm^2'ye 0,204 gram veya 0,204 µL). Her bir formülasyon için en az 2 hücre çalışıldı. İnkübasyon süresi sonunda deri yüzeyindeki formülasyon fazlası kuru bir kağıt peçete yardımı ile uzaklaştırıldı.

Her bir deri kesiti, ATR-FTIR cihazı (Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer, Shelton, CT, USA) ile analiz edildi. 4000-650 nm aralığında alınan her bir spektrum 10 taramanın bileşiminden oluştu. Deri lipitlerinden kaynaklanan CH_2 simetrik

(2850 cm^{-1}) ve CH_2 asimetrik (2920 cm^{-1}) gerilme bantlarının absorbanslarındaki değişimler değerlendirildi. 12 saatlik uygulama sonrasında *stratum corneum* hücrelerarası lipitlerinin yapısal düzeni ve akışkanlığında meydana gelen değişiklikler saptandı. Değerlendirme için Perkin Elmer version 6.0.2 yazılımı kullanıldı.

3.2.17. Nil Kırmızı Yüklü Mikroemülsiyonların Derinin Tabakalarındaki Penetrasyonun Konfokal Mikroskop Görüntüleme Tekniği (CLSM) ile İncelenmesi Çalışmaları

Deri permeasyonunun gerçekleştiği yolları ve permeasyonun kapsamının incelemek için konfokal mikroskop görüntüleme tekniği kullanıldı. Yöntemde tüm kalınlıkta domuz derisi ile çalışıldı. Yöntem 3.2.13.'te anlatıldığı gibi domuz derisi çalışma öncesi hazırlandı. Çalışmada deri kesitleri, Franz tipi difüzyon hücrelerinin (12 mL hacim ve etkin difüzyon alanı 1,77 cm^2) boyutunda kesilerek reseptör ve donör kompartmanlar arasına yerleştirildi. Su banyosu 37°C'ye sabitlendi.

Donor faz olarak nil kırmızısı ile hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonları ile nil kırmızısı eklenmiş PBS süspansiyonu uygulandı. Formülasyon miktarları hücrelerdeki difüzyon alanına göre belirlendi (360 µL). Her bir formülasyon için en az 2 hücre çalışıldı. 12 saatlik uygulama süresi sonunda deri yüzeyindeki formülasyon fazlası kuru bir kağıt peçete yardımı ile uzaklaştırıldı.

Her bir deri kesiti, küçük parçalar halinde kesildi ve "*doku dondurma ortamı*" çözeltisi kullanılarak kriyomikrotom cihazı içinde donduruldu. Dondurulma sonrası deri numuneleri, cihazın kesit alma bölümüne yerleştirildi ve sabitlendi. Daha sonra deri örnekleri 20 µm kalınlığında dikey olarak (xz düzlemde) kesildi ve lam üzerine alındı. Örnekler lazer taralamalı konfokal mikroskop altında incelendi. Nil Kırmızısı floresan özelliğe sahip olup 543 nm dalga boyunda uyarılır ve 630 nm dalga boyunda floresan sinyali saptanır (Park ve ark. 2008). Bu özellikler dikkate alınarak deri örnekleri mikroskop altında tarandı ve 10x büyütme ölçeği kullanılarak xz düzlemde görüntülendi.

3.2.18. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Stabilite Çalışmaları

İlaç şekillerinin geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken önemli noktalardan biri etkin maddenin ve etkin madde ve taşıyıcı sistemin oluşturduğu ürünün stabilitesidir. Her etkin madde kimyasal bütünlüğünü veya belirtilen potensini, önceden saptanmış sınırlar içinde korumalıdır (Acartürk 2007 p.141).

Bu amaçla hazırlanan formülasyonlar belirlenen sürelerde ve koşullarda olmak üzere stabilite kabinlerinde bekletildi. Her süre sonunda ön görülen kimyasal analizleri (etkin madde geri kazanımları ve safsızlık analizleri) ve fiziksel ölçümleri (pH, iletkenlik, viskozite, PS, PDI, RI ve zeta potansiyeli) yapılarak başlangıç verileri ile karşılaştırıldı.

3.2.18.1. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyonunun Stabilitesinin Değerlendirilmesi

İki etkin maddeyi de içeren mikroemülsiyonun [CLT (1:2)] stabilitesi 2-8°C sıcaklık 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nem, 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nem koşullarında 6 ay süre ile izlendi. Kimyasal stabilitesinin değerlendirilmesi kapsamında formülasyon içindeki etkin madde miktarını saptamak için miktar tayini çalışmaları, formülasyondaki safsızlıkları belirlemek için safsızlık çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar yöntem 3.2.4.1.'de belirtilen HPLC analizi koşullarında yürütüldü. Hareketli faz yöntem 3.2.4.2.'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Miktar tayini yönteminde 25 mg takrolimus tartılarak 50 mL' lik bir balon jojede asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile hacmine tamamlandı ve stok çözelti hazırlandı (0,5 mg/mL Takrolimus stok çözeltisi). Benzer şekilde 20 mg fusidik asit tartılarak 50 mL' lik bir balon jojede aynı çözücü ile hacmine tamamlandı ve stok çözelti hazırlandı (0,4 mg/mL Fusidik asit stok çözeltisi).

Takrolimus stok çözeltisinden 2 mL, fusidik asit stok çözeltisinden 4 mL alınarak 20 mL' lik bir balon jojeye aktarıldı. Daha sonra balon joje asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile hacmine tamamlanarak standart çözelti hazırlandı (0,05 mg/mL takrolimus; 0,08 mg/mL fusidik asit standart çözeltisi).

Mikroemülsiyondaki takrolimus miktarının saptanması için 2,5 g formülasyon tartıldı. 50 mL'lik bir balon jojeye aktarılarak, üzerine bir miktar asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edildi. Ultrasonik banyoda bekletilerek çözünme sağlandı, balon joje aynı çözücü ile hacmine tamamlandı (0,05 mg/mL Takrolimus numune çözeltisi). Fusidik asit miktarının saptanması için 50 mL'lik bir balon jojeye 4 mL Takrolimus numune çözeltisi'den aktarıldı ve hacmine asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile tamamlandı (0,08 mg/mL Fusidik asit numune çözeltisi).

Hem takrolimus hem de fusidik asit numune çözeltileri şırınga ucu (Millex-LCR, PTFE, 0,45 µm Milipore) filtre ile süzülerek HPLC şişelerine alındı. Örnekler HPLC ile analiz edildi.

Hesaplamalar aşağıdaki eşitlikler ile yapıldı.

$$mg/g\ Takrolimus = \frac{R_N}{R_S} x \frac{W_N}{50} x \frac{2}{20} x \frac{50}{W_N} \qquad (3\text{-}3)$$

R_N : Numune çözeltisinden elde edilen takrolimus pikinin alanı

R_S : Standart çözeltiden elde edilen takrolimus pikinin alanı

W_S : Takrolimus çalışma standardının tartımı, mg

W_N : Numune tartımı, g

$$mg/g\ Fusidik\ Asit = \frac{R_N}{R_S} x \frac{W_N}{50} x \frac{4}{20} x \frac{50}{W_N} x \frac{50}{4} \qquad (3\text{-}4)$$

R_N : Numune çözeltisinden elde edilen fusidik asit pikinin alanı

R_S: Standart çözeltiden elde edilen fusidik asit pikinin alanı

W_S : Fusidik asit çalışma standardının tartımı, mg

W_N: Numune tartımı, g

Formülasyonun safsızlık çalışmaları için hem etkin maddeleri içermeyen plaseboları hem de tek etkin madde içeren plaseboları hazırlandı. Plasebo formülasyonlar etkin madde içeren formülasyonlarla eş zamanlı olarak stabilite kabinlerine yerleştirildi ve stabiliteleri takip edildi.

Safsızlık yönteminde 25 mg takrolimus tartılarak 50 mL'lik bir balon jojede asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile hacmine tamamlandı. Bu çözeltiden 1 mL alınarak 50 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmine aynı çözücü ile tamamlandı (0,01 mg/mL Takrolimus stok çözeltisi). Fusidik asit stok çözeltisi miktar tayini yönteminde olduğu gibi hazırlandı (0,4 mg/mL Fusidik asit stok çözeltisi).

Takrolimus stok çözeltisinden 5 mL, fusidik asit stok çözeltisinden 2,5 mL alınarak 100 mL' lik bir balon jojeye aktarıldı. Daha sonra balon joje asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile hacmine tamamlanarak standart çözelti hazırlandı (0,0005 mg/mL Takrolimus; 0,01 mg/mL Fusidik asit standart çözeltisi).

Mikroemülsiyondaki etkin maddelerin safsızlıklarının araştırılması için 2,5 g formülasyon tartıldı. 25 mL'lik bir balon jojeye aktarılarak, miktar tayininde belirtildiği gibi hazırlandı (0,1 mg/mL Takrolimus; 2,0 mg/mL Fusidik asit numune çözeltisi). Hem takrolimus hem de fusidik asit numune çözeltileri HPLC şişelerine 0,45 mm Millex-LCR (PTFE) filtre ile süzülerek alındı, HPLC ile analiz edildi.

Safsızlık çalışmaları kapsamında değerlendirme için stabiliteleri takip edilen plasebo formülasyonlar da mikroemülsiyon numune çözeltisinde olduğu gibi hazırlanarak HPLC'de analiz edildi.

Hesaplamalar aşağıdaki eşitlikler ile yapıldı.

Takrolimus;

$$\%\ Bilinen\ safsızlık = \frac{R_N}{R_S}\ x\ \frac{W_S}{50} x \frac{1}{50} x \frac{5}{100} x \frac{25}{W_N} x100 \quad (3\text{-}5)$$

R_N : Numune çözeltisinden elde edilen bilinen safsızlık pik alanı

R_S : Standart çözeltisinden elde edilen takrolimus pik alanı

W_S : Takrolimus çalışma standart tartımı (mg)

W_N : Numune tartımı, g

$$\%\ En\ Büyük\ Bilinmeyen\ Safsızlık = \frac{R_N}{R_S} x \frac{W_S}{50} x \frac{1}{50} x \frac{5}{100} x \frac{25}{W_N} x100 \quad (3\text{-}6)$$

R_N : Numune çözeltisinden elde edilen bilinmeyen safsızlık pik alanı

R_S : Standart çözeltisinden elde edilen takrolimus pik alanı

W_S : Takrolimus çalışma standart tartımı (mg)

W_N : Numune tartımı, g

Fusidik asit;

$$\%\ Bilinen\ safsızlık = = \frac{R_N}{R_S}\ x\ \frac{W_S}{50} x \frac{2,5}{100} x \frac{25}{W_N} x \frac{25}{W_N}\ x\ \frac{100}{20} \quad (3\text{-}7)$$

R_N : Numune çözeltisinden elde edilen bilinen safsızlık pik alanı

R_S : Standart çözeltisinden elde edilen fusidik asit pik alanı

W_S : Fusidik asit çalışma standart tartımı (mg)

W_N : Numune tartımı, g

$$\%\ Bilinmeyen\ safsızlık = = \frac{R_N}{R_S}\ x\ \frac{W_S}{50} x \frac{2,5}{100} x \frac{25}{W_N} x \frac{25}{W_N} x \frac{100}{20} \quad (3\text{-}8)$$

R_N : Numune çözeltisinden elde edilen bilinmeyen safsızlık pik alanı

R_S : Standart çözeltisinden elde edilen fusidik asit pik alanı

W_S : Fusidik asit çalışma standart tartımı (mg)

W_N : Numune tartımı, g

$$\%\ Toplam\ Safsızlıklar = \sum Bilinen\ Safsızlıklar + \sum Bilinmeyen\ Safsızlıklar \quad (3\text{-}9)$$

Mikroemülsiyonun fiziksel stabilitesinin değerlendirilmesi için pH, iletkenlik, viskozite, PS, PDI, RI ve zeta potansiyeli ölçümleri yapıldı.

3.2.18.2. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesinin Değerlendirilmesi

Takrolimus içeren dört mikroemülsiyon formülasyonlarının (OLT-CEL OLT, OTT-PEG ve OTT) stabiliteleri 2-8°C sıcaklık ile 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem koşullarında 3 ay süre ile takip edildi. Kimyasal stabilitesinin değerlendirilmesinde formülasyon içindeki etkin madde miktarını saptamak için miktar tayini çalışmaları yapıldı.

Miktar tayini yönteminde 5 mg takrolimus tartılarak 10 mL'lik bir balon jojede asetonitril ve su 70:30 (h:h) çözücüsü ile hacmine tamamlandı ve stok çözelti hazırlandı (0,5 mg/mL Takrolimus stok çözeltisi). Stok çözeltiden 1 mL alınarak 10 mL'lik bir balon jojeye aktarıldı. Daha sonra balon joje aynı çözücü ile hacmine tamamlanarak standart çözelti hazırlandı (0,05 mg/mL Takrolimus standart çözeltisi).

Mikroemülsiyonlardaki takrolimus miktarının saptanması için her bir formülasyondan 0,5 g tartıldı. 10 mL'lik bir balon jojelere aktarılarak yöntem 3.2.16.1.'de anlatıldığı gibi hazırlandı (0,05 mg/mL Takrolimus numune çözeltisi).

3.2.19. *In vivo* Koşullarda Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonunun Deri Üzerindeki Etkilerinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesi

Deriye uygulanan mikroemülsiyonun deri üzerindeki etkileri hakkında bilgi sahibi olmak için 10 sağlıklı gönüllünün ön kol bölgesindeki derisi üzerine formülasyonların uygulanması öncesinde ve sonrasında biyofiziksel ölçümler ile ATR-FTIR ölçümleri yapıldı. Söz konusu *in vivo* çalışmalar için oluşturulan protokol, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 14.08.2015 tarihli ve 13 sayılı toplantısında incelenerek etik yönden uygunluğu 18.05.2015 tarihli ve 1314 numaralı etik kurul onay yazısı ile bildirilmiştir.

Ölçüm öncesi, sağlıklı gönüllü ölçümlerin yapılacağı odaya alındı. Ön kol bölgesinde 2x2cm'lik alan belirlendi ve işaretlendi. Gönüllü 20 dakika süre ile odada kalması sağlanarak, gönüllünün derisinin oda koşulları ile uyumlanması sağlandı. (21-23°C, %40-45 bağıl nem). İşaretlenen uygulama alanında kontrol ölçümleri yapılarak

bazal değerler belirlendi. Bu ölçümler deri hidratasyonunun, deri pH ve renginin ölçümü, transepidermal su kaybı ölçümü ve deri lipitlerinin yapısal düzeninin ölçümü şeklinde yapıldı, sonuçlar kaydedildi. Ölçümler en az üç kere tekrarladı. TEWL değerlendirilmesi için tek seferde 60 ölçüm kaydedildi. ATR-FTIR analizi içinse tek ölçüm yapıldı.

Etkin maddeleri içermeyecek şekilde hazırlanan mikroemülsiyon formülasyonu bir süre bekledikten sonra sağlıklı gönüllünün ön kolunda 2x2 cm olarak belirlenenen ve işaretlenen aynı alana 300 µL miktarında tek sefer uygulandı. 1 saat uygulama süresinin sonunda formülasyon fazlası kağıt peçete yardımı ile silindi. 20 dakika süre ile beklenerek derinin ortam koşulu ile uyumlanması sağlandı. Daha sonra uygulama bölgesinde belirtilen ölçümler belirtilen sayılarda tekrarlandı, sonuçlar kaydedildi.

3.2.20. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Fiziksel Kontrolleri

Optimizyonu yapılan merhem formülasyonlarının görünüş, pH ve viskoziteleri incelendi.

3.2.20.1. Görünüş

Merhem formülasyonları fiziksel görünüş, homojenite ve renk özellikleri açısından oda sıcaklığında değerlendirildi.

3.2.20.2. pH

Merhem formülasyonlarında pH değeri, potansiyometrik titrasyon ile pH tayini metoduna göre yapıldı ve %10'luk çözeltiden değerlendirildi. Bu amaçla; 1,00 g merhem beher içine tartılarak üzerine 10 mL saf su ilave edildi. 70°C sıcaklıktaki manyetik karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra sıcaklığın dengelenmesi için bir süre beklendi ve filtre kağıdıyla deney tüpüne süzüldü. Söz konusu süzüntünün pH değeri 25°C'de normal elektrot veya katılara uygun elektrot ile ölçüldü.

3.2.20.3. Viskozite

Merhem formülasyonlarının akış özellikleri araştırmak için viskoziteleri 29-30ºC Brookfield viskozimetresinde TF mil (spindle) ile 10 rpm' de çalışılarak ölçüldü.

3.2.21. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Stabilite Çalışmaları

Optimizasyon çalışması tamamlanan merhemlerin (MR-TC-9 ve MR-PC-6) stabiliteleri 2-8°C sıcaklık 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem, 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nem, 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nem koşullarında 6 ay süre ile

izlendi. Her süre sonunda ön görülen kimyasal analizleri (etkin madde geri kazanımları ve safsızlık analizleri) ve fiziksel ölçümleri (pH ve viskozite) yapılarak başlangıç verileri ile karşılaştırıldı.

Merhem formülasyonlarındaki takrolimus ve fusidik asit miktarlarının saptanması için çalışmalar, yöntem 3.2.18.1.'de "Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyonunun Stabilitesinin Değerlendirilmesi" bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı.

Bu kapsamda, etkin maddelerin aynı konsantrasyonlarda stok ve standart çözeltileri hazırlandı. Merhem formülasyonları da aynı miktarda tartılarak aynı konsantrasyonlara sahip numune çözeltileri hazırlandı. Farklı olarak, balon joje içine tartılan ve üzerine bir miktar asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ilave edilen formülasyonların erimesi için 20 dakika çalkalayıcılı su banyosunda 70°C'de bekletildi. Bu süre sonunda buz banyosuna alınarak soğutuldu. Oda sıcaklığına gelmesi için beklendi. Asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile tamamlanarak GF/A (Glass-Microfiber 110 mm) filtre kağıdından süzüldü (0,05 mg /mL Takrolimus numune çözeltisi). Fusidik asit numune çözeltisi için 50 mL'lik bir balon jojeye 4 mL ''Takrolimus numune çözeltisi'den aktarıldı ve hacmine asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile tamamlandı. GF/A (Glass-Microfiber 110 mm) filtre kağıdından süzüldü (0,08 mg/mL Fusidik asit numune çözeltisi).

Merhem formülasyonlarının safsızlık çalışması için de aynı miktarda formülasyonlar tartılarak aynı konsantrasyonlarda numune çözeltileri miktar tayini yönteminde belirtilen erime ve soğutma prosedürlerine göre hazırlandı (0,1 mg/mL Takrolimus numune çözeltisi; 2,0 mg/mL Fusidik asit numune çözeltisi). Benzer şekilde, safsızlık çalışmalarında stabiliteleri takip edilen her iki merhem formülasyonu için de plasebo formülasyonları, merhem numune çözeltileri gibi hazırlanarak HPLC'de analiz edildi. Hesaplamalar da yöntem 3.2.18.1.'de beliritlen Eşitlikler (3-3)-(3-9)'a göre yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

Fiziksel stabilitelerin değerlendirilmesi için pH ve viskozite ölçümleri sırasıyla yöntem 3.2.20.2. ve yöntem 3.2.20.3'te anlatıldığı gibi yapıldı.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda üç aylık stabilite çıktılarına göre birim formül belirlendi. MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonu ile *in vitro* salım ve *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları yapıldı.

3.2.22. Merhem Formülasyonundan Etkin Maddelerin Sentetik Membrandan *In Vitro* Salım Çalışmaları

In vitro salım çalışmaları yöntem 3.2.21.'de yürütülen stabilite çalışmaları ile belirlenen takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve pazarda bulunan ticari ürünler ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Yöntem 3.2.1.3.'te anlatıldığı gibi sonsuz seyrelme koşulunu sağlamak için reseptör faz (PBS:Etanol karışımı (70:30; h:h) belirlendi. Salım çalışmaları PermeGear Franz tipi difüzyon hücrelerinin (14 mL hacim ve etkin difüzyon alanı 4,91 cm^2) ile selüloz nitrat yapısında membranlar (0,45 µm 50 mm Sartorious®) kullanılarak yapıldı. Etkin maddelerin salım profili, Fick'in Birinci Yasası'na göre ve Higuchi kinetik modeline göre değerlendirildi.

$$J = \frac{dM}{S\,dt} = -D\,(dc/dx)$$ "Fick'in Birinci Yasası" **(3-10)**

J= Moleküllerin bir bölgeden diğer bir bölgeye difüzyon hızı yani birim zamanda (t) birim alandan (S) geçen madde miktarını

D=Difüzyon katsayısı, (cm^2/saniye) molekülün bulunduğu ortamda birim zamanda ne kadarlık bir alanı geçebildiğini veya ortamdan uzaklaşma yeteneğini

dc/dx= Konsantrasyon gradyanı-derişimi (miktar/hacim, g/cm^3) ve x, molekülün yüzeye paralel olarak katettiği mesafeyi (cm)

"-" işareti, molekül hareketinin daha az yoğun bölgeye doğru olduğunu, yoğun bölgeden uzaklaştıkça derişimin azaldığını ve bu nedenle *J* değerinin her zaman "+" olacağını ifade eder (Tırnaksız 2007 p. 114).

$$Q = k.\,t^{1/2}$$ "Higuchi kinetik modeli" **(3-11)**

Q= Birim yüzeyden salınan ilaç miktarını

k= salım hızı sabitini

t= zamanı temsil eder (Higuchi 1963; Çapan 2002 pp. 46-47).

Çalışmalarda, su banyosu 37°C'ye ayarlandı. Reseptör faz ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra hücrelere dolduruldu, her bir hücreye manyetik karıştırıcı bırakıldı. Membranlar çalışma öncesi derinin en üst tabakası *stratum corneum*'un taklit edilmesi amaçlı izopropil miristat (IPM) içinde 30 dakika bekletildikten sonra hücrelere yerleştirildi (Pople ve Singh 2010; Pople ve Singh 2011). Formülasyonlar 1 gram olacak şekilde tartılarak donör faza yerleştirildi. Her bir formülasyon için en az 6 hücre çalışıldı.

Donor faz olarak pazarda mevcut olan ürünler Protopic® merhem, Fucidin® merhem, fomülasyonlar olarak takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem ile etkin

maddelerin birbirlerinin salım hızını etkileyip etkilemediğini araştırmak için (El Maghraby ve ark. 2014) sadece takrolimus yüklü merhem ve sadece fusidik asit yüklü merhem uygulandı. Fusidik asit etkin maddesini karşılaştırabilmek için pazarda bulunan ürün olarak su içermeyen formu olan Fucidin merhem kullanıldı. 1. 2. 4. 6. ve 8. saatlerde 0,3 mL örnek alındı ve yerine aynı miktarda reseptör faz ilave edildi. Örnekler seyreltilmeden şırınga ucu filtrelerden (0,45 µm, PTFE, Millex®-LCR) süzüldü. Takrolimus etkin maddesinin salım karakteristiği için numuneler LC-MS'de; fusidik asitin salım karakteristiği için numuneler HPLC'de analiz edildi.

3.2.23. Merhem Formülasyonundan Etkin Maddelerin Domuz Derisinden *In Vitro* Penetrasyon Çalışmaları

Dermal tabakalardaki etkin maddelerin miktar tayini yöntem 3.2.15.'te anlatıldığı gibi yapıldı. *In vitro* deriden penetrasyon çalışmaları yöntem 3.2.21.'de yürütülen stabilite çalışmaları ile belirlenen takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ile yürütüldü. Bu doğrultuda, geliştirilen takrolimus ve fusidik asiti bir arada içeren merhem formülasyonun *in vitro* koşullarda deriden penetrasyonu, pazarda bulunan takrolimus (Protopic® merhem) ve fusidik asidin sodyum tuzu (Fucidin® merhem) içeren ticari ürünler ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

3.2.24. Etkin Madde Yüklü Merhem Formülasyonunun ATR-FTIR (Azaltılmış toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmaları

Merhem formülasyonunun bileşenlerinin deri üzerindeki etkileri ATR-FTIR spekroskopisi çalışması ile incelendi. Çalışma, yöntem 3.2.16.'da anlatıldığı gibi yapıldı. Çalışmalarda, yöntem 3.2.23.'te olduğu gibi geliştirilen takrolimus ve fusidik asiti bir arada içeren merhem formülasyonunun (MR-PC-6) *in vitro* koşullarda deri üzerindeki etkileri, pazarda bulunan takrolimus (Protopic® merhem) ve fusidik asidin sodyum tuzu (Fucidin® merhem) içeren ticari ürünler ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

3.2.25. İstatiksel Analiz

In vitro salım çalışmalarının sonuçları GraphPad Prism 5.01 programı kullanılarak Two Way Anova, Bonferroni Multiple Comparison Test uygulaması ile istatiksel olarak analiz edildi. *In vitro* deriden penetrasyon çalışmalarının sonuçları GraphPad Prism 5.01 programı kullanılarak One Way Anova, Tukey Multiple Comparison Test uygulaması ile istatiksel olarak analiz edildi. Mikroemülsiyon ve

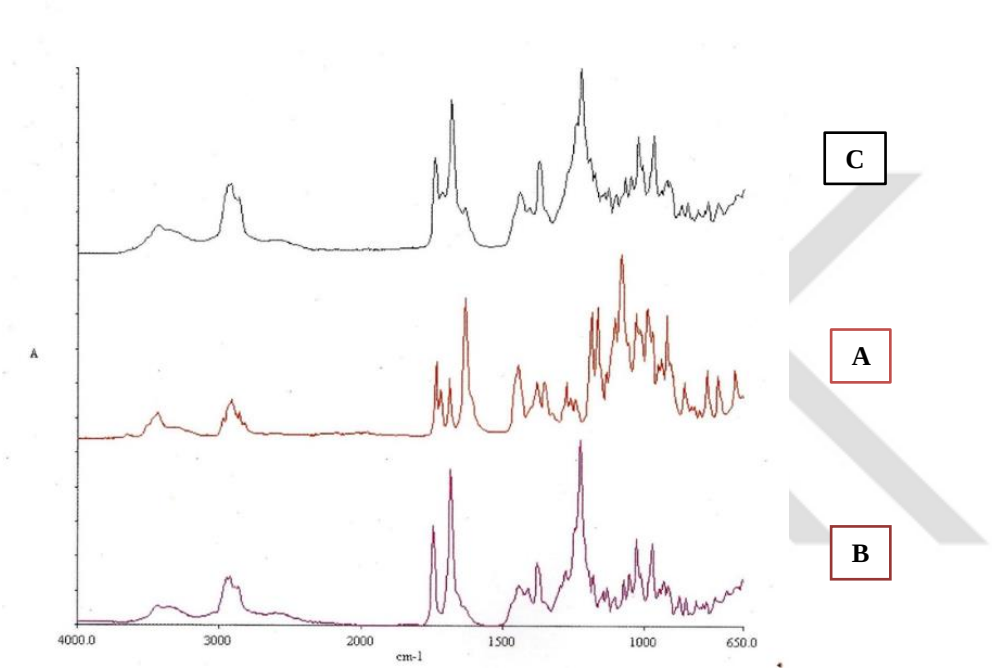
merhem formülasyonlarının etkin madde miktar tayini bulguları ise aynı program uygulanarak One Way Anova, Dunnett's Multiple Comparison Test uygulamaları ile istatistiksel analiz edildi. *In vivo* çalışmalarda uygulama öncesi ve formülasyon bileşenlerinin uygulanması sonrası deri üzerindeki değişimlerin istatistiksel değerlendirilmesi için aynı program kullanılarak, non-parametrik t testi, Wilcoxon işaret sırama testi (Wilcoxon signed rank test) uygulandı. Yapılan tüm çalışmalarda anlamlı fark sınırı $p < 0,05$ belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Ön Formülasyon Çalışma Bulguları

4.1.1. Etkin Maddelerin İnfrared (IR) Spektrumu Bulguları

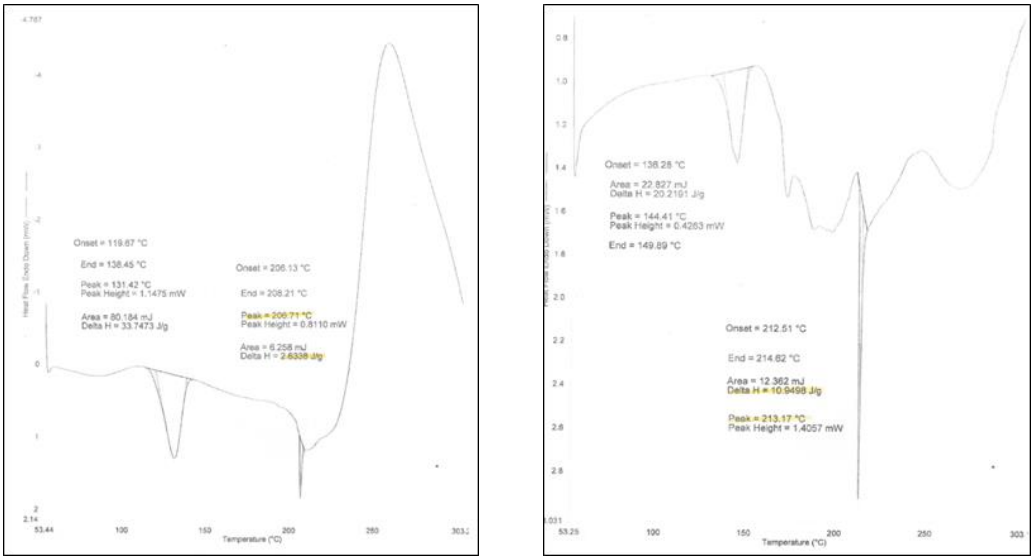
Yöntem 3.2.1.1.'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmada elde edilen takrolimus, fusidik asit ve her iki etkin maddenin fiziksel karışımına ait FT-IR spektrumu Şekil 4-1'de görülmektedir.



Şekil 4-1: Takrolimusun (A), fusidik asidin (B) ve her iki etkin maddenin fiziksel karışımının (C) IR spektrumu

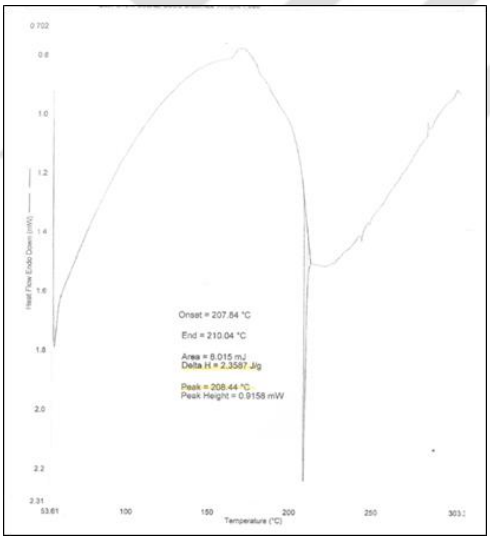
4.1.2. Etkin maddelerin Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi (DSC) Analizlerine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.2.'de anlatıldığı şekilde yapılan çalışmada takrolimus, fusidik asit ve her ikisinin karışımına ait termogramlar Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te gösterilmektedir.



(505) **(II)**

Şekil 4-2: Takrolimus (I) ve Fusidik asidin (II) DSC termogramları



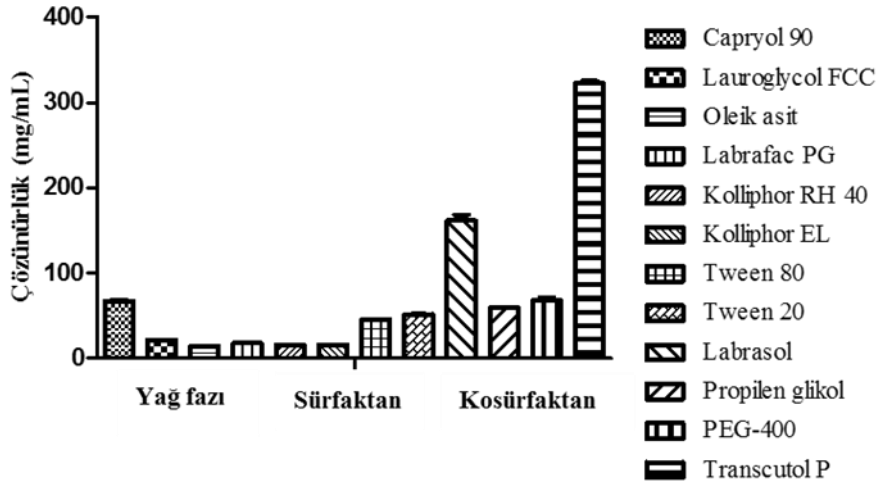
Şekil 4-3: Takrolimus ve Fusidik asit karışımının DSC termogramı

4.1.3. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenlerindeki Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulguları

Yöntem 3.2.1.3.'te anlatıldığı gibi çalışma yapıldı. Bu çalışmayla etkin maddelerin formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeler içindeki çözünürlükleri saptandı. Çalışma bulguları Tablo 4-1 ile Tablo 4-2 ve Şekil 4-4 ile Şekil 4-5'te gösterilmektedir.

Tablo 4-1: Takrolimusun yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü (n=3)

	Yardımcı madde	mg/mL ±SD
Yağlar	Capryol 90	67,29 ±1,37
	Lauroglycol FCC	21,91 ±0,04
	Oleik asit	14,48 ±0,26
	Labrafac PG	17,88 ±0,07
Sürfaktanlar	Kolliphor RH 40	15,76 ±0,02
	Kolliphor EL	15,91 ±0,38
	Tween 80	45,88 ±0,26
	Tween 20	51,78 ±0,40
	Labrasol	161,67 ±6,87
Kosürfaktanlar	Propilen glikol	59,39±0,75
	PEG-400	68,21±2,93
	Transcutol P	322,71 ±2,70



Şekil 4-4: Takrolimusun yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü

Tablo 4-2: Fusidik asidin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü (n=3)

	Yardımcı madde	mg/mL±SD
Yağlar	Capryol 90	98,08±1,32
	Lauroglycol FCC	62,21±3,46
	Oleik asit	27,92±0,30
Sürfaktanlar	Labrafac PG	6,62±0,00
	Kolliphor RH 40	57,42±0,07
	Kolliphor EL	56,12±1,94
	Tween 80	58,21±0,23
	Tween 20	105,87±0,31
	Labrasol	126,97±0,22
Kosürfaktanlar	Propilen glikol	87,96±1,29
	PEG-400	122,39±2,93
	Transcutol P	353,04±7,58



Şekil 4-5: Fusidik asidin yardımcı maddelerdeki çözünürlüğü

4.1.4. Etkin Maddelerin Çözünme Ortamlarındaki Çözünürlük Çalışmalarına Ait Bulguları

Yöntem 3.2.1.4.'te belirtildiği gibi çalışılarak *in vitro* salım çalışmalarında sonsuz seyrelme koşulunu sağlayan çözünme ortamı belirlendi. Çalışma bulguları Tablo 4-3'te sunulmaktadır. Elde edilen bulgulara göre, sink koşulun sağlanması açısından PBS:Etanol karışımı (70:30; h:h) reseptör faz olarak belirlendi.

Tablo 4-3: Etkin maddelerin reseptör fazlardaki çözünürlük bulguları (n=3)

Reseptör Ortamı	Takrolimus (mg/mL)	Fusidik asit (mg/mL)
PBS:Etanol (70:30)	0,51±0,00	2,57±0,11
PBS:Propilen glikol (70:30)	0,12±0,02	1,34±0,09
PBS:PEG 400 (70:30)	0,17±0,01	0,41±0,18

4.1.5. Etkin Maddelerin Mikroemülsiyon ve Merhem Formülasyonları Bileşenleri ile Safsızlık Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.1.5.'te anlatıldığı gibi çalışılarak, etkin madde ve yardımcı maddeler arasındaki etkileşim incelendi. Çalışmalarda etkin madde takrolimus için, *Tautomer 19-epimer, Takrolimus 8-propil* ve *Takrolimus 8-epimer* safsızlıkları çalışıldı. Fusidik asit için ise *G* ve *I* safsızlıkları çalışıldı. Bulgular toplam safsızlık olarak sunuldu. Söz konusu bulgular Tablolar 4-4, 4-5, 4-6 gösterilmektedir.

Tablo 4-4: Etkin maddelerin toplam safsızlık değerleri (%)

Etkin maddeler	Toplam Safsızlık (%)		
	Başlangıç zamanı	40°C %75 RH 30 gün sonra	60°C 7 gün sonra
Takrolimus	0,0	0,0	0,0
Fusidik asit	0,98	1,0	1,6
Fusidik asit:Takrolimus	1,1	1,0	1,6

Tablo 4-5: Fiziksel karışımlarda etkin maddelerin toplam safsızlık değerleri (%)

Fiziksel karışımlar	Toplam Safsızlık (%)	
	Başlangıç zamanı	40°C %75 RH 15 gün
Takrolimus:Oleik asit	0,48	2,9
Takrolimus: Kolliphor RH 40	0,0	24,3
Takrolimus :Kolliphor EL	0,0	29,6
Takrolimus :Propilen glikol	0,0	0,17
Fusidik asit:Oleik asit	0,74	1,5
Fusidik asit : Kolliphor RH 40	0,92	3,6
Fusidik asit :Kolliphor EL	0,72	2,5
Fusidik asit :Propilen glikol	0,90	3,1
Fusidik asit:Takrolimus:Oleik asit	0,97	5,3
Fusidik asit :Takrolimus: Kolliphor RH 40	0,97	45,7
Fusidik asit: Takrolimus :Kolliphor EL	0,92	35,4
Fusidik asit :Takrolimus :Propilen glikol	0,99	3,0

Tablo 4-6: Fiziksel karışımlarda etkin maddelerin toplam safsızlık değerleri (%)

Fiziksel karışımlar	Toplam Safsızlık (%)		
	Başlangıç zamanı	40°C %75 RH 15 gün	40°C %75 RH 30 gün
Takrolimus:Transcutol P	0,0	4,5	5,6
Takrolimus: Capryol 90	0,0	0,0	0,88
Takrolimus:Propilen karbonat	0,0	0,0	0,40
Takrolimus: Triasetin	0,0	0,0	0,34
Fusidik asit:Transcutol P	0,80	1,8	1,6
Fusidik asit: Capryol 90	0,68	0,71	0,82
Fusidik asit: Propilen karbonat	0,70	0,84	0,83
Fusidik asit: Triasetin	0,90	1,1	1,6
Fusidik asit:Takrolimus:Transcutol P	0,89	1,8	2,6
Fusidik asit:Takrolimus:Capryol 90	0,89	1,4	1,8
Fusidik asit:Takrolimus:Propilen karbonat	0,91	0,80	2,6
Fusidik asit:Takrolimus: Triasetin	1,0	0,94	2,6

4.2. Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Mikroemülsiyonlar yöntem 3.2.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak hazırlandı. Mikroemülsiyonların optimizasyonu için, su tutma kapasitesinin yüksek olmasına önem verildi. Bu amaçla yağ:sürfaktan:kosürfaktan oranları 1:9, 2:8, 3:7 olarak çalışılarak su içinde yağ mikroemülsiyonları hazırlandı. Hazırlanan formülasyonların görsel olarak incelenmesinin ardından, faz ayrımı olmayan, berraklığını koruyan ve toplamda %25-%50 aralığında su içeren mikroemülsiyon formüllerinin damlacık boyutu ve polidisperiste indeksleri (PDI) ölçüldü. Bu ölçümlere ait bulgular Tablo 4-7, Tablo 4-8 ve Tablo 4-9'da gösterilmektedir.

Tablo 4-7: Tek sürfaktan ve kosürfaktan içeren mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve dağılımı (PDI) sonuçları (n=3)

Formül kodu	Damlacık boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)
OLT	3,40±3,20	0,28±0,00
OLC_{EL}	12,50±6,14	0,18±0,01
OLC_{EL}-1	11,98±5,49	0,37±0,03
OLC_{RH}	22,0±3,09	0,43±0,01
$OC_{RH}T$	13,5±1,07	0,42±0,01
$OT_{80}T$	9,81±0,42	0,36±0,02
$OT_{80}T$-1	9,62±3,04	0,37±0,01
$OT_{80}T$-2	30,06±0,77	0,32±0,01
$OT_{80}T$-3	5,79±1,99	0,47±0,00
$OT_{80}T$-4	10,95±0,46	0,18±0,01
OTT	4,13±0,94	0,55±0,01
OTT-1	3,53±0,30	0,47±0,01
$OC_{EL}T$	7,45±0,61	0,16±0,01
$OC_{EL}T$-1	14,65±1,43	0,49±0,03
$OC_{EL}T$-1	149,23±4,87	0,23±0,03
$OC_{EL}T$-3	21,89±0,41	0,16±0,01
$L_{PG}LC_{EL}$	4,49±1,11	0,86±0,01
$L_{PG}LC_{EL}$-1	45,01±1,06	1,00±0,01
CLT (1:1)	2,64±0,98	0,37±0,01
CLT (1:1)-1	4,98±0,79	0,28±0,02
CLT (1:1)-2	3,91±0,61	0,21±0,00
CLT (1:2)	3,71±0,72	0,25±0,01
CLT (1:2)-1	4,41±1,78	0,12±0,01
CLT (2:1)	3,58±0,53	0,19±0,01
CLT (2:1)-1	10,97±2,24	0,05±0,01
LLT (1:1)	4,95±0,14	0,41±0,01
LLT (1:1)-1	16,38±1,45	0,22±0,01
LLT (2:1)	2,99±0,51	0,26±0,00
LLT (2:1)-1	10,03±6,22	0,28±0,03

Tablo 4-8: İki kosürfaktan içeren mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve dağılımı ölçüm (PDI) sonuçları (n=3)

Formül kodu	Damlacık boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)
OTT-PEG	9,22±0,49	0,22±0,01
OTT-PEG-1	6,38±1,91	0,09±0,01
OTT-PEG-2	15,42±9,65	0,13±0,05

Tablo 4-9: İki sürfaktan içeren mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve dağılımı ölçüm (PDI) sonuçları (n=3)

Formül kodu	Damlacık boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)
OLT-C_{EL}	6,38±0,19	0,32±0,01
OLT-C_{EL}-1	5,95±1,05	0,42±0,01
OLT-C_{EL}-2	17,42±4,07	0,39±0,18

Formülasyon çalışmaları verileri doğrultusunda, hem takrolimus hem de fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren mikroemülsiyon formülasyonları için her iki etkin maddeyi de en yüksek çözündürme kapasitesine sahip, yağ fazı Capryol 90 (Takrolimus 67,29 mg/mL ve Fusidik asit 98,08 mg/mL) ile hazırlanan S:KoS oranı sırasıyla 1:1, 2:1 ve 1:2 olan mikroemülsiyonlarla [CLT (1:1), CLT (2:1) ve CLT (1:2)] çalışılmaya karar verildi.

Yağ fazı olarak, penetrasyon artırıcı etkiye sahip oleik asit ile hazırlanan mikroemülsiyonlar değerlendirildi. Bu mikroemülsiyonlardan sürfaktan olarak Tween 80 içerenlerde ($OT_{80}T$, $OT_{80}T$-1, $OT_{80}T$-2, $OT_{80}T$-3 ve $OT_{80}T$-4) bir süre sonra jelleşme gözlendi.

Yağ fazı oleik asit, sürfaktan veya kosürfaktan olarak Kolliphor RH içeren mikroemülsiyonlar (sırasıyla $OC_{RH}T$ veya OLC_{RH}) ise damlacık boyutu ve dağılımı açısından uygun olmalarına rağmen akışkanlıkları yetersiz bulundu.

Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile oleik asit, Kolliphor EL ve Transcutol P içeren mikroemülsiyonlara ($OC_{EL}T$, $OC_{EL}T$-1, $OC_{EL}T$-2 ve $OC_{EL}T$-3), ikinci sürfaktan olarak Labrasol eklenmesiyle hazırlanan mikroemülsiyonların (OLT-$C_{EL,}$ OLT-C_{EL}-1, OLT-C_{EL}-2) daha yüksek su tutma kapasitelerine sahip oldukları (yaklaşık olarak %30 →%40) saptandı.

Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile oleik asit, Tween 20 ve Transcutol P içeren mikroemülsiyonlara (OTT, OTT-1) ikinci kosürfaktan olarak PEG 400'ün eklenmesiyle hazırlanan mikroemülsiyonlarda (OTT-PEG, OTT-PEG-1, OTT-PEG-2) PDI'nın azaldığı (0,55→0,22) ve formülasyonların akışkanlıklarının artığı saptandı.

Bu veriler kapsamında; yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile oleik asit, Labrasol veya Labrasol+Kolliphor EL, Transcutol P içeren mikroemülsiyon formülasyonları (OLT-CEL ve OLT) ile çalışılmaya karar verildi.

Aynı zamanda yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile oleik asit, Tween 20 ve Transcutol P veya Transcutol P+PEG 400 içeren mikroemülsiyon formülasyonları (OTT ve OTT-PEG) daha sonraki yapılacak çalışmalar için seçildi.

4.2.1. Üçgen Faz Diyagramlarının Çizilmesine Ait Bulgular

Mikroemülsiyonlardaki bileşenlerin konsantrasyon aralığını belirleyebilmek için üçgen faz diyagramları yöntem 3.2.2.1.'de anlatıldığı gibi çalışılarak hazırlandı.

Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile; Capryol 90, Labrasol, ve Transcutol P, S:KoS oranları ise 1:1, 2:1, 1:2 olan mikroemülsiyonların üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablolar 4-10, 4-11 ve 4-12'de bu mikroemülsiyonlara ait faz diyagramları Şekil 4-6, 4-7 ve 4-8'de gösterilmektedir.

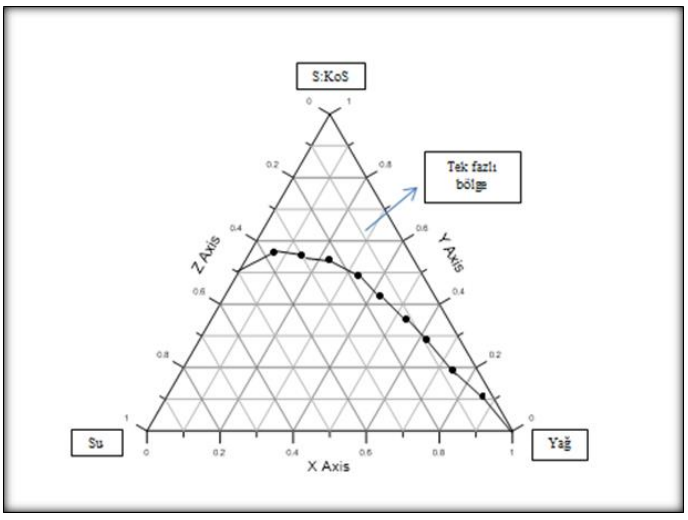
Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile; oleik asit, Labrasol:Kolliphor EL (SI:SII= 2:1) ve Transcutol P, S:KoS oranı 1:1 olan mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-13'te, faz diyagramı Şekil 4-9'da gösterilmektedir. Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile; oleik asit, Labrasol ve Transcutol P, S:KoS oranı 1:1 olan mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-14'te, faz diyagramı Şekil 4-10'da gösterilmektedir.

Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile; oleik asit, Tween 20 ve Transcutol P:PEG 400 (KoSI:KoSII=3:1), S:KoS oranı 1:2 olan mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-15'te, faz diyagramı Şekil 4-11'de gösterilmektedir. Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile; oleik asit, Tween 20 ve Transcutol P ve S:KoS oranı 1:1 olan

mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-16'da, faz diyagramı Şekil 4-12'de gösterilmektedir.

Tablo 4-10: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları

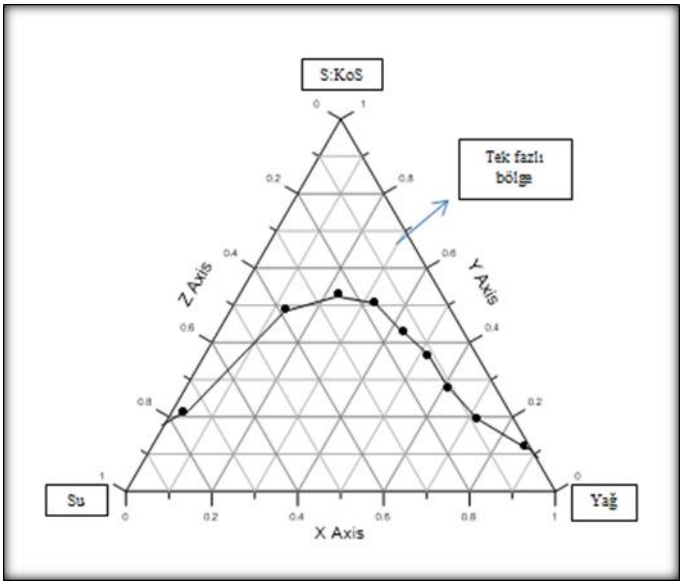
Yağ:[S:Ko-S]	Capryol 90	Labrasol :Transcutol P (1:1)	Su
1:9	6,4	56,5	37,1
2:8	14,1	55,8	20,1
3:7	22,8	54,3	22,9
4:6	33,0	49,3	17,7
5:5	42,2	42,7	15,1
6:4	53,0	35,4	11,6
7:3	61,8	29,1	9,1
8:2	73,6	19,5	6,9
9:1	86,3	11,1	2,7



Şekil 4-6: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı

Tablo 4-11: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları

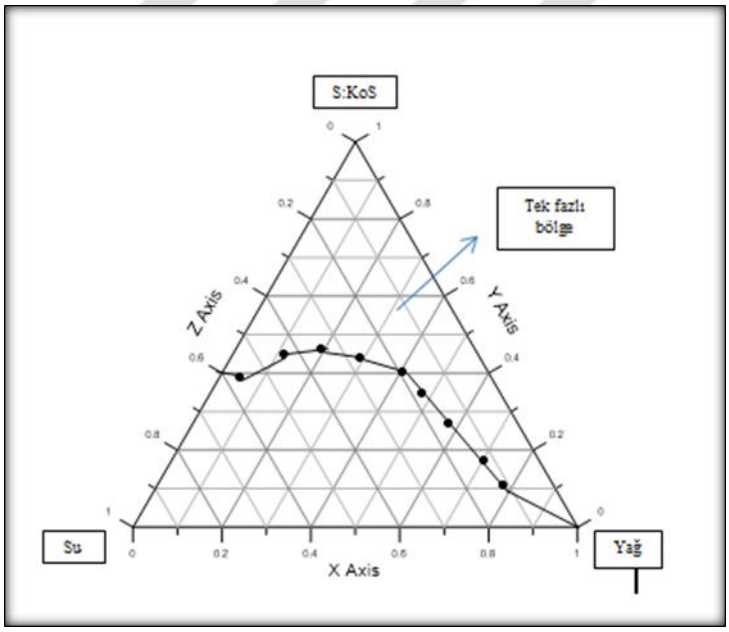
Yağ:[S:Ko-S]	Capryol 90	Labrasol :Transcutol P (2:1)	Su
1:9	2,4	21,5	76,1
2:8	12,5	48,9	38,6
3:7	23,0	53,0	24,0
4:6	32,3	50,9	16,8
5:5	42,9	43,0	14,1
6:4	51,8	36,6	11,6
7:3	61,1	27,7	11,3
8:2	71,8	19,5	8,6
9:1	86,5	12,0	1,5



Şekil 4-7: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı

Tablo 4-12: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:2 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları

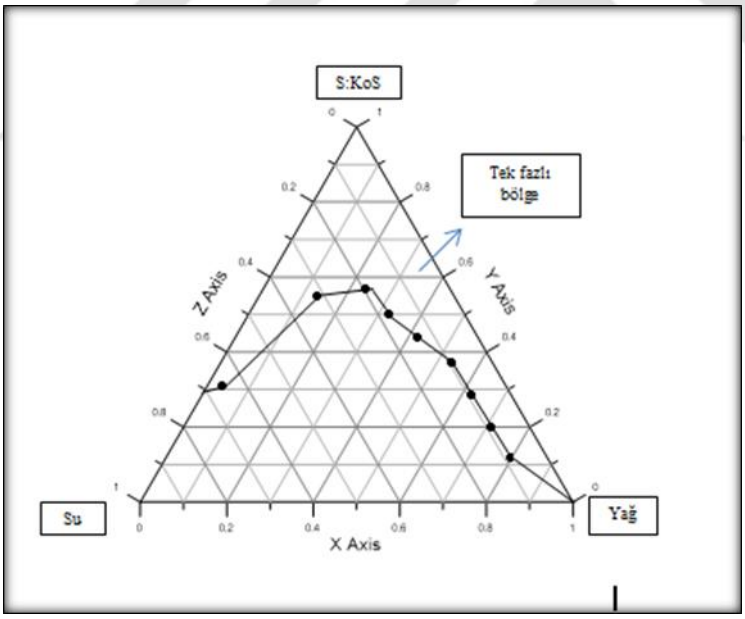
Yağ:[S:Ko-S]	Capryol 90	Labrasol :Transcutol P (1:2)	Su
1:9	4,7	38,9	56,4
2:8	11,4	45,0	43,7
3:7	19,2	46,3	34,6
4:6	29,1	44,2	26,6
5:5	40,3	40,5	19,2
6:4	47,6	34,6	17,8
7:3	57,4	27,2	15,5
8:2	70,2	17,5	12,3
9:1	78,1	10,8	11,1



Şekil 4-8: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol/Transcutol P oranı 1:2 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı

Tablo 4-13: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları

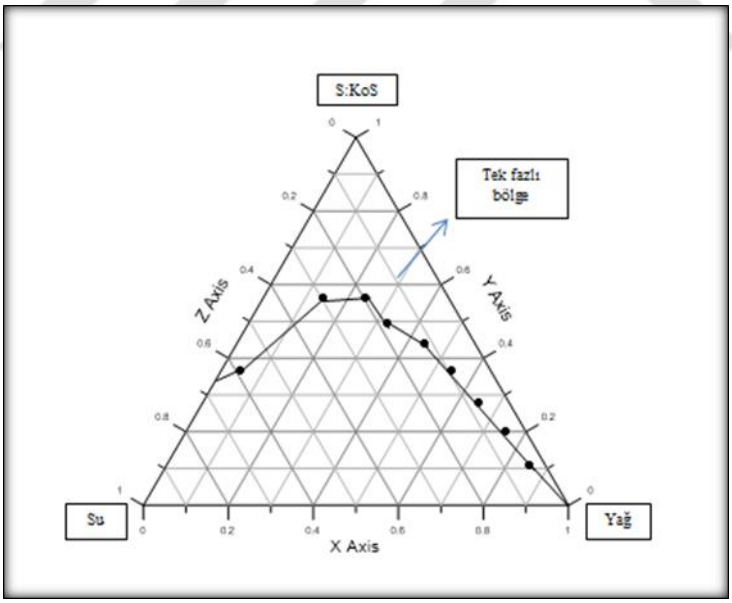
Yağ:[S:Ko-S]	Oleik asit	Labrasol –Kolliphor EL:Transcutol P (1:1)	Su
1:9	3,7	30,7	65,6
2:8	13,6	54,7	31,7
3:7	24,0	56,6	19,4
4:6	32,6	49,9	17,5
5:5	42,5	43,6	13,9
6:4	53,6	36,8	9,6
7:3	62,6	28,1	9,3
8:2	71,2	19,7	9,1
9:1	79,9	11,6	8,5



Şekil 4-9: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı

Tablo 4-14: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları

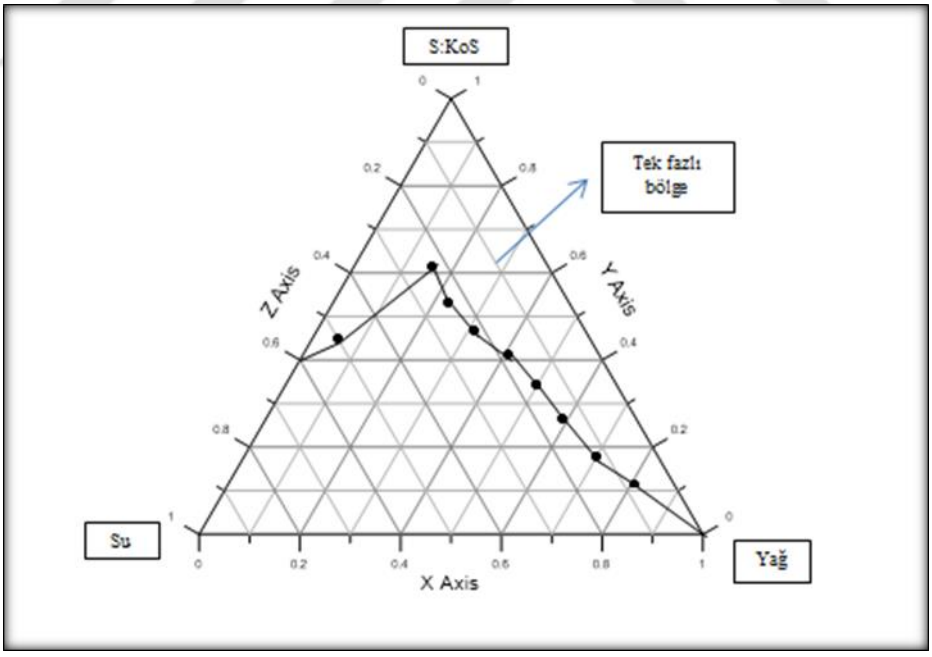
Yağ:[S:Ko-S]	Oleik asit	Labrasol :Transcutol P (1:1)	Su
1:9	4,3	36,7	59,0
2:8	14,1	56,3	29,6
3:7	23,8	56,2	20,0
4:6	32,6	49,5	17,9
5:5	44,0	43,9	12,1
6:4	54,1	36,5	9,5
7:3	64,8	28,0	7,2
8:2	74,9	19,8	5,2
9:1	85,4	10,7	3,9



Şekil 4-10: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı

Tablo 4-15: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları

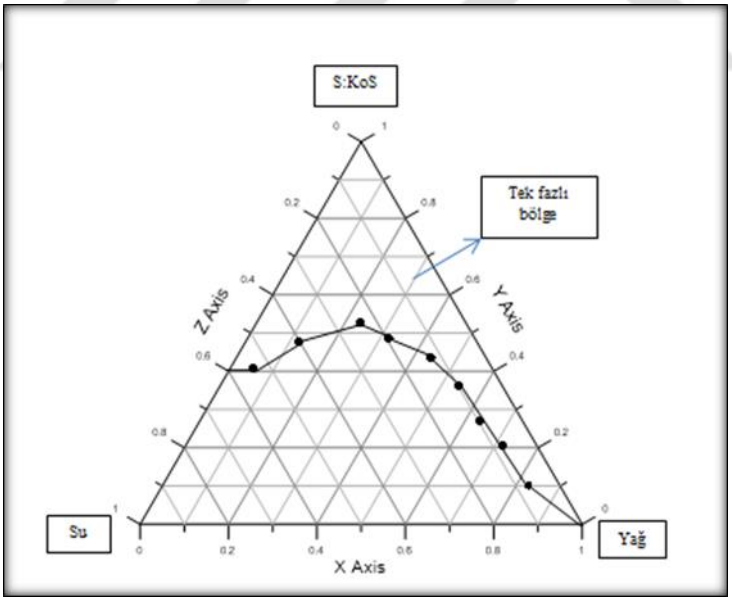
Yağ:[S:Ko-S]	Oleik asit	Tween 20:Transcutol P-PEG 400 (1:2)	Su
1:9	5,3	44,9	49,8
2:8	15,6	61,3	23,1
3:7	22,9	53,2	23,9
4:6	31,4	46,7	21,9
5:5	40,9	40,9	18,1
6:4	50,0	34,3	15,7
7:3	59,0	26,6	14,4
8:2	71,7	15,9	12,5
9:1	80,9	11,4	7,7



Şekil 4-11: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı

Tablo 4-16: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikromülsiyonlara ait üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile yüzde miktarları

Yağ:[S:Ko-S]	Oleik asit	Tween 20:Transcutol P (1:1)	Su
1:9	7,7	7,7	84,6
2:8	18,6	18,6	62,8
3:7	32,9	32,9	34,3
4:6	38,0	38,0	24,0
5:5	43,8	43,8	12,4
6:4	45,7	45,7	8,6
7:3	46,5	46,5	7,1
8:2	47,5	47,5	5,0
9:1	47,9	47,9	4,2



Şekil 4-12: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonlara ait üçgen faz diyagramı

4.2.2. Mikroemülsiyonların Seçilmesine Ait Bulgular

Yöntem 3.2.2.2.'de belirtildiği gibi, önformülasyon çalışmaları kapsamında yapılan çözünürlük ve safsızlık çalışmaları verileri ile mikroemülsiyonların su tutma kapasiteleri, damlacık boyutu ve dağılımları, fiziksel görünümleri dikkate alınarak ayrıca üçgen faz diyagramlarındaki mikroemülsiyon oluşum alanları değerlendirilerek etkin madde/maddeler yüklenecek mikroemülsiyonlar seçildi. Seçilen mikroemülsiyonlar Tablo 4-17 ve Tablo 4-18'de gösterilmektedir.

Tablo 4-17: Yağ fazı Capryol 90 olan mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzdeleri*

Formülasyon Bileşenleri	CLT-(1:1)	CLT-(2:1)	CLT-(1:2)
Capryol 90	5-10	5-10	5-10
Labrasol	25-35	30-40	15-20
Transcutol P	25-35	15-20	25-35
Su	25-35	35-45	35-45

(*) Tabloda yer alan formülasyonlar SanTez projesi kapsamından hazırlanmış olup CLT-(1:2) mikroemülsiyonu için patent başvurusu yapılmıştır. Bu nedenle formülasyonların bileşenlerinin yüzde değerleri aralık olarak sunulmaktadır (Patent başvuru numaraları; TR201510399 ve TR201513223)

Tablo 4-18: Yağ fazı Oleik asit olan mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzdeleri

Formülasyon Bileşenleri	OLT-CEL	OLT	OTT-PEG	OTT
Oleik asit	5,8	6,7	5,8	6,7
Labrasol	17,6	30,4	-	-
Kolliphor EL	8,2	-	-	-
Tween 20	-	-	17,6	30,4
Transcutol P	25,8	30,4	26,4	30,4
PEG 400	-	-	8,8	-
Su	k.m.100	k.m.100	k.m.100	k.m.100

4.3. Etkin Madde Yüklenmemiş Merhem Formülasyonlarının Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.3.'te anlatıldığı gibi merhem formülasyonları hazırlandı. Hazırlanan merhemlerin formülasyon bileşenleri aralık olarak Tablo 4-19, Tablo 4-20 ve tablo 4-

21'de sunulmaktadır. Tablolarda yer alan merhem formülasyonları SanTez projesi kapsamından hazırlandığı ve patent başvurusu yapıldığı için bileşenlerin yüzde değerleri aralık olarak verilmiştir (Patent başvuru numarası TR201510398).

Tablo 4-19: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan çözücüsü Transcutol P ve Capryol 90 olan merhem formülasyonlarının kodları ve yüzdeleri

Madde isimleri	MR-TC-1	MR-TC-2	MR-TC-3	MR-TC-4	MR-TC-5	MR-TC-6	MR-TC-7
Transcutol P	5-15	5-15	5-15	5-15	5-15	5-15	5-15
Capryol 90	5-15	10-25	5-15	5-15	5-15	5-15	10-25
Sıvı parafin	5- 15	10-20	5- 15	5- 15	5- 15	5- 15	10-20
Vazelin	60-70	55-65	60-70	55-65	60-70	60-70	60-70
Setostearil alkol	5-15	5-15	5-15	5-15	-	-	-
Balmumu	-	-	-	-	5-15	5-15	5-15

Tablo 4-20: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan çözücüsü Triasetin olan merhem formülasyonlarının kodları ve yüzdeleri

Madde isimleri	MR-TA-1	MR-TA-2	MR-TA-3	MR-TA-4	MR-TA-5
Triasetin	5-15	5-15	5-15	5-15	5-15
Sıvı parafin	45-60	45-60	40-60	40-60	40-50
Propilen glikol	-	5-15	-	5-15	-
Balmumu	5-15	5-15	4-10	4-10	4-10
Katı parafin	-	-	3-10	3-10	10-20
Vazelin	20-35	20-35	25-35	25-35	25-35

Tablo 4-21: Formülasyon çalışmalarında hazırlanan çözücüsü Propilen karbonat olan merhem formülasyonlarının kodları ve yüzde miktarları

Madde isimleri	MR-PC-1	MR-PC-2	MR-PC-3	MR-PC-4	MR-PC-5
Propilen karbonat	5-15	5-15	5-15	5-15	5-15
Sıvı parafin	45-60	45-60	40-60	40-60	40-50
Propilen glikol	-	5-15	-	5-15	-
Balmumu	5-15	5-15	4-10	4-10	4-10
Katı parafin	-	-	3-10	3-10	10-20
Vazelin	20-35	20-35	25-35	25-35	25-35

4.4. Etkin Maddelerin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular

Formülasyonların değerlendirilmesi kapsamında yapılan çalışmalarda hazırlanan örneklerdeki takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin miktarlarının hesaplanması için yöntem 3.2.4.'te anlatıldığı gibi çalışıldı.

İlk olarak hareketli fazdaki organik fazın yüzdesi artırıldı. Hareketli faz, analizlerde A hareketli fazı %65 ve B hareketli fazı %35 oranlarında gradient olarak çalışıldı. Daha sonra her iki etkin maddenin analizlerde güvenilir bir şekilde miktar tayini limitlerini artırmak ve aynı zamanda piklerin keskinliği koruyarak kromatogramları elde etmek için, uygulanan örneklerin enjeksiyon hacmi artırılarak 100 µL olarak uygulandı.

Takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin safsızlık analizleri için de aynı hareketli faz kullanıldı. Gradient koşulları miktar tayini yöntemine göre tekrar optimize edilerek A hareketli fazı %70 ve B hareketli fazı %30 oranlarında gradient olarak çalışıldı.

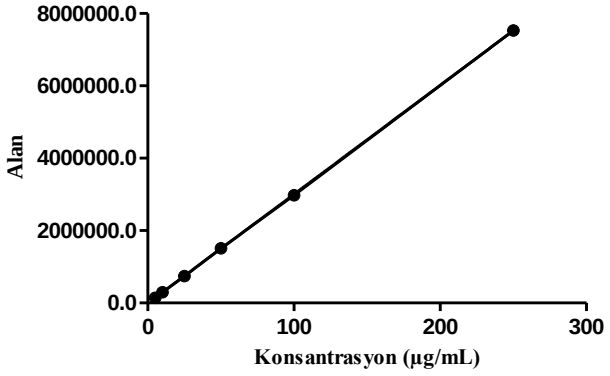
4.5. Takrolimusun HPLC ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları

4.5.1. Standart Örneklerin Hazırlanmas

Yöntem 3.2.5.1.'de anlatıldığı gibi çalışılarak 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

4.5.2. Doğrusallık

Yöntem 3.2.5.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4-13'te, standart eğri hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanı değerleri, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%RSD) sonuçları Tablo 4-22'de, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ise Tablo 4-23'te verilmektedir.



Şekil 4-13: Takrolimusun doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği

Tablo 4-22: Takrolimusun miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	144568,00	1690,26	1,17
10	295429,00	1512,53	0,51
25	744397,33	7288,49	0,98
50	1509125,33	24541,92	1,63
100	2978592,67	13979,64	0,47
250	7530945,33	51898,06	0,69

Tablo 4-23: Takrolimusun doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi

Doğru denklemi	y= 30129x-8959,4
Determinasyon katsayısı (r^2)	1

(y= Alan x= Konsantrasyon)

4.5.3. Kesinlik

Yöntem 3.2.5.3.'te kesinlik bölümünde anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik bulguları sırasıyla Tablo 4-24 ve Tablo 4-25'te verilmektedir.

Tablo 4-24: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	143678,33	1691,39	1,18
25	740808,00	2709,18	0,37
50	1500236,33	24541,92	1,64

Tablo 4-25: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Birinci gün	İkinci gün	Üçüncü gün	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	144315	144959	141761	143678,33	1691,39	1,18
25	739537	738968	743919	740808,00	2709,18	0,37
50	1486897	1485253	1528559	1500236,33	24541,92	1,64

4.5.4. Doğruluk

Yöntem 3.2.5.4.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak her formülasyonun %100'lük konsantrasyon için geri kazanma değerleri ile SD ve % RSD değerleri Tablo 4-26'da sunulmaktadır.

Tablo 4-26: Plasebo formülasyonların %100 konsantrasyonları için doğruluk çalışması (n=3)

Formülasyon adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri kazanım ortalamaları	SD (±)	RSD (%)
Plasebo 1	100	99,08	0,08	0,08
Plasebo 2	100	98,85	0,14	0,14
Plasebo 3	100	98,91	0,04	0,04
Plasebo 4	100	98,80	1,00	1,01

4.5.5. Seçicilik

Yöntem 3.2.5.5.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak etkin madde içermeyen formülasyonların, etkin madde takrolimus pikinin alıkonma zamanında girişim yapmadıkları saptandı.

4.5.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.2.5.6.'da anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar göre TL= 0,0200 µg/mL ve MTL= 0,0607 µg/mL olarak bulundu.

4.5.7. Stabilite

Yöntem 3.2.5.7.'de beliritildiği şekilde çalışılarak takrolimusun stabilitesi incelendi. 50 µg/mL konsantrasyonda örnek çözeltilerin stabilite bulguları Tablo 4-27'de verilmektedir.

Tablo 4-27: Takrolimusun stabilite bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman	Alan	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
50	0. saat	1485525	1485569,25	449,34	0,03
	24. saat	1485065			
	48. saat	1486159			
	72. saat	1485528			

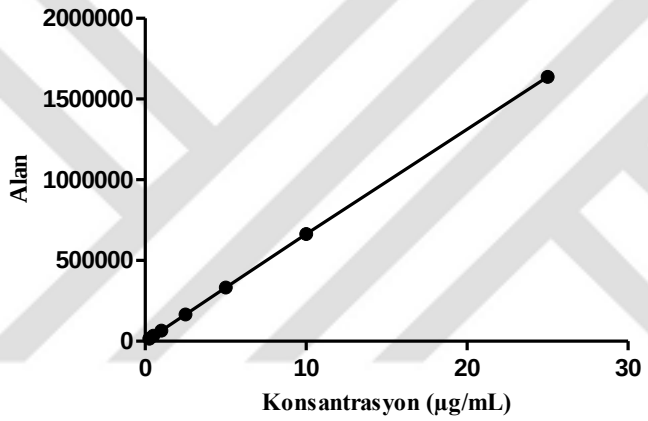
4.6. Fusidik Asitin HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları

4.6.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

Yöntem 3.2.6.1.'de anlatıldığı gibi çalışılarak 25, 10, 5 2,5, 1, 0,5 ve 0,25 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

4.6.2. Doğrusallık

Yöntem 3.2.6.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4-14'te, standart eğri hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanı değerleri, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%RSD) sonuçları Tablo 4-28'te, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ise Tablo 4-29'da verilmektedir.



Şekil 4-14: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği

Tablo 4-28: Fusidik asitin miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
0,25	16476,33	369,40	2,24
0,5	34251,33	588,86	1,72
1	65770,00	991,10	1,51
2,5	165860,67	559,84	0,34
5	332910,67	921,60	0,28
10	663840,67	455,33	0,07
25	1636870,33	3017,01	0,18

Tablo 4-29: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi

Doğru denklemi	y= 65489x+2584,4
Determinasyon katsayısı (r^2)	1

y= Alan x= Konsantrasyon

4.6.3. Kesinlik

Yöntem 3.2.6.3.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik bulguları sırasıyla Tablo 4-30 ve Tablo 4-31'de verilmektedir.

Tablo 4-30: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
1	65281,33	272,91	0,42
2,5	165458,00	392,35	0,24
5	349075,67	5672,74	1,63

Tablo 4-31: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Birinci gün	İkinci gün	Üçüncü gün	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
1	65282	67743	65753	66259,33	1306,30	1,97
2,5	162701	163738	162754	163064,33	584,01	0,36
5	330128	330429	330187	330248,00	159,50	0,05

4.6.4. Deriden ve Banttan Fusidik asidin Geri Kazanımı (Doğruluk)

Yöntem 3.2.6.4.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak deri ve bantlardaki geri kazanım miktarları ve yüzdeleri ile SD değerleri Tablo 4-32 ve Tablo 4-33'te sunulmaktadır.

Tablo 4-32: Fusidik asitin bant numunelerinden geri kazanımı (n=3)

Uygulanan miktar/cm^2 (µg)	Geri kazanılan miktar/cm^2 Ortalama ±SD (µg)	Geri kazanılan % Ortalama ±SD (µg)
4,73	4,86±0,06	102,75±1,21
23,63	22,23±0,23	94,06±0,98

(±) Standart sapma

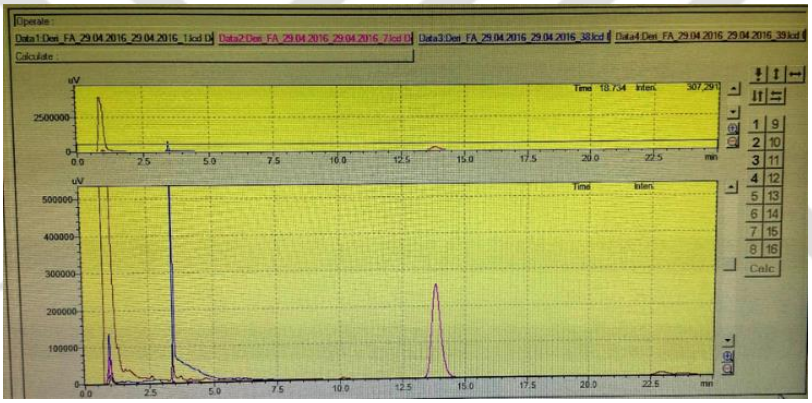
Tablo 4-33: Fusidik asitin deri numunelerinden geri kazanımı (n=3)

Uygulanan miktar/cm^2 (µg)	Geri kazanılan miktar/cm^2 Ortalama ±SD (µg)	Geri kazanılan % Ortalama ±SD (µg)
4,73	4,39±0,06	92,82±1,23
23,63	21,42±0,37	90,65±1,56

(±) Standart sapma

4.6.5. Seçicilik

Yöntem 3.2.6.5.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak derinin ve bandın fusidik asit pikinin alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptandı. Şekil 4-15'te seçicilik çalışması bulguları gösterilmektedir.



Şekil 4-15: Fusidik asitin seçicilik çalışması ile elde edilen blank, boş deri, boş bant ve 100 µg/mL'lik standart çözeltilerine ait çakıştırılmış kromatogramlar

4.6.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.2.6.6.'da belirtildiği şekilde yapılan çalışmalar göre TL= 0,0057 µg/mL ve MTL= 0,0174 µg/mL olarak bulundu.

4.6.7. Stabilite

Yöntem 3.2.6.7.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak fusidik asidin stabilitesi incelendi. 25 µg/mL konsantrasyonda örnek çözeltilerin stabilite bulguları Tablo 4-34'de verilmektedir.

Tablo 4-34: Fusidik asidin stabilite bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman	Alan	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
25	1. saat	1597601	1600697,00	6315,78	0,39
	24. saat	1600535			
	48. saat	1595089			
	72. saat	1609563			

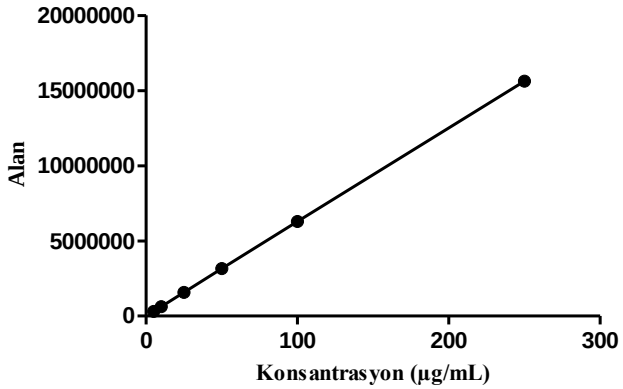
4.7. Fusidik Asitin *In Vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan HPLC Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları

4.7.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

Yöntem 3.2.7.1.'de anlatıldığı gibi çalışılarak 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 µg/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

4.7.2. Doğrusallık

Yöntem 3.2.7.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4-16'da, standart eğri hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanı değerleri, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (%RSD) sonuçları Tablo 4-35'de, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ise Tablo 4-36'da verilmektedir.



Şekil 4-16: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği

Tablo 4-35: Fusidik asitin miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	313815,33	4047,79	1,29
10	626919,00	12046,54	1,92
25	1576614,33	26555,65	1,68
50	3157022,00	55449,91	1,76
100	6295434,33	76437,02	1,21
250	15625091,67	186145,75	1,19

Tablo 4-36: Fusidik asitin doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi

Doğru denklemi	y= 62491x+16513
Determinasyon katsayısı (r^2)	1

y= Alan x= Konsantrasyon

4.7.3. Kesinlik

Yöntem 3.2.7.3.'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik bulguları sırasıyla Tablo 4-37 ve Tablo 4-38'de verilmektedir.

Tablo 4-37: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	312590,33	3986,65	1,28
25	1571416,00	29713,41	1,89
50	3140113,33	64346,56	2,05

Tablo 4-38: Fusidik asitin miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (µg/mL)	Birinci gün	İkinci gün	Üçüncü gün	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	314993	316163	311499	314218,33	2426,58	0,77
25	1588121	1605804	1554824	1582916,33	25885,45	1,64
50	3152920	3212656	3102194	3155923,33	55292,21	1,75

4.7.4. Doğruluk

Yöntem 3.2.7.4.'te belirtildiği şekilde çalışılarak merhem formülasyonun %100'lük konsantrasyon için geri kazanma değerleri ile SD ve % RSD değerleri Tablo 4-39'da sunulmaktadır.

Tablo 4-39: Merhem plasebo formülasyonunun %100 konsatrasyonları için doğruluk çalışması

Formülasyon Adı	Konsantrasyon (µg/mL)	% Geri kazanım ortalamaları	SD (±)	RSD (%)
Merhem Plasebo Formülasyonu	100	100,60	1,23	1,23

4.7.5. Seçicilik

Yöntem 3.2.7.5.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak etkin madde içermeyen formülasyonun fusidik asit pikinin alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptandı.

4.7.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.2.7.6.'da anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar göre TL= 0,0389 µg/mL ve MTL= 0,1178 µg/mL olarak bulundu.

4.7.7. Stabilite

Yöntem 3.2.7.7.'de belirtildiği gibi çalışılarak fusidik asidin stabilitesi incelendi. 25 µg/mL konsantrasyonda örnek çözeltilerin stabilite bulguları Tablo 4-40'ta verilmektedir.

Tablo 4-40: Fusidik asitin stabilite bulguları

Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman	Alan	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
25	0. saat	630347,00	631937,29	12122,68	1,92
	2. saat	629986,00			
	4. saat	646880,00			
	6. saat	647456,00			
	8. saat	613530,00			
	24. saat	623424,00			
	48. saat	631938,00			

4.8. Takrolimusun Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (LC-MS) ile Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesine Ait Bulgular

Takrolimus içeren formülasyonların *in vitro* salım çalışması ile *in vitro* deriden penetrasyon çalışması örneklerinin analizinde litaratürde takrolimus için kayıtlı LC-MS yöntemi (Goebel ve ark. 2011) bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı.

Hem *in vitro* salım hem de *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında *elektrospray* voltajı artırıldı ve 5000 volt olarak çalışıldı *In vitro* salım çalışması için hareketli fazdaki formik asit yüzdesi artırılarak hareketli faz A %0,1'lik formik asit çözeltisi olarak hazırlandı. *In vitro* deriden penetrasyon çalışması içinse enjeksiyon hacmi artırılarak 10 µL ıugulandı.

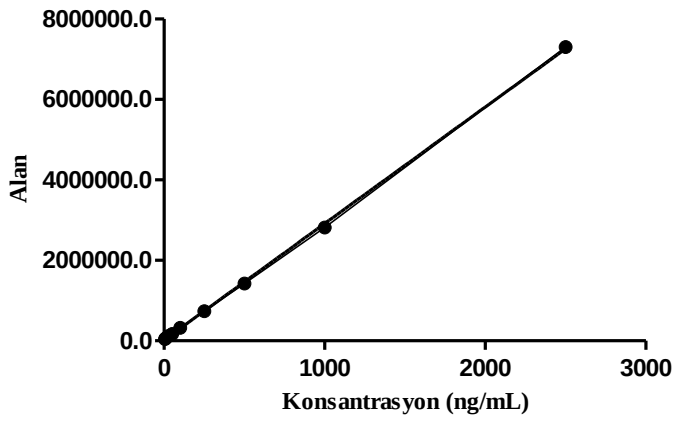
4.9. Takrolimusun *In Vitro* Salım Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yöntemin Validasyon Bulguları

4.9.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

Yöntem 3.2.9.1.'de anlatıldığı gibi çalışılarak 2500, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 ng/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

4.9.2. Doğrusallık

Yöntem 3.2.9.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4-17'de, standart eğri hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanı değerleri, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) sonuçları Tablo 4-41'de, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ise Tablo 4-42'de verilmektedir.



Şekil 4-17: Takrolimusun doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği

Tablo 4-41: Takrolimusun miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	44543,67	8745,71	19,63
10	65642,00	12100,87	18,43
25	119724,00	21177,10	17,69
50	171656,33	32544,59	18,96
100	322749,67	68303,28	21,16
250	735419,00	189257,23	25,73
500	1426260,00	362742,56	25,43
1000	2818991,00	722373,27	25,63
2500	7303602,00	1335934,68	18,29

Tablo 4-42: Takrolimusun doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi

Doğru denklemi	y= 2897,1x+16140
Determinasyon katsayısı (r^2)	0,9997

y= Alan x= Konsantrasyon

4.9.3. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.2.9.3.'te anlatıldığı şekilde yapılan çalışmalar göre TL= 0,6229 ng/mL ve MTL= 1,8877 ng/mL olarak bulundu.

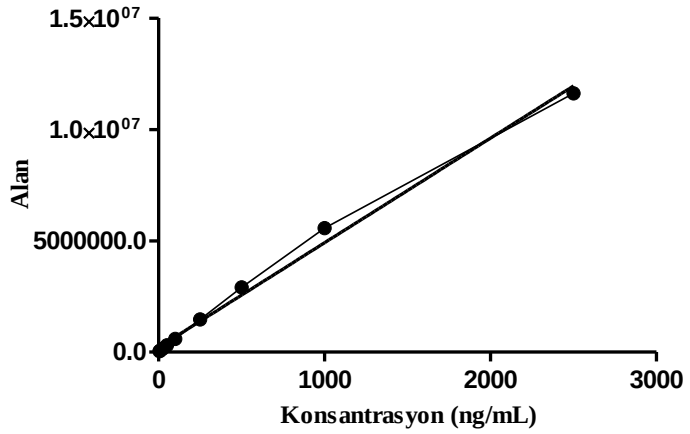
4.10. Takrolimusun *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarında Kullanılan LC-MS Miktar Tayini Yönteminin Validasyon Bulguları

4.10.1. Standart Örneklerin Hazırlanması

Yöntem 3.2.10.1.'de anlatıldığı gibi çalışılarak 2500, 1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10 ve 5 ng/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı.

4.10.2. Doğrusallık

Yöntem 3.2.10.2.'de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen standart eğri grafiği Şekil 4-18'de, standart eğri hazırlanmasında kullanılan ortalama pik alanı değerleri, standart sapma (SD) ve bağıl standart sapma (% RSD) sonuçları Tablo 4-43'te, doğru denklemi ve determinasyon katsayısı ise Tablo 4-44'te verilmektedir.



Şekil 4-18: Takrolimusun doğrusallık çalışmasından elde edilen standart eğri grafiği

Tablo 4-43: Takrolimusun miktar tayini yönteminin doğrusallığına ait bulgular (n=3)

Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
5	44959,67	2994,66	6,66
10	70402,00	7766,40	11,03
25	159749,67	8974,45	5,62
50	311009,33	21541,58	6,93
100	596882,67	11559,06	1,94
250	1472236,00	116535,70	7,92
500	2903390,33	155983,53	5,37
1000	5563435,67	451619,87	8,12
2500	11622616,67	433774,63	3,73

Tablo 4-44: Takrolimusun doğrusallık çalışmasında elde edilen determinasyon katsayısı ve doğru denklemi

Doğru denklemi	y= 4697,8+209616
Determinasyon katsayısı (r^2)	0,9934

y= Alan x= Konsantrasyon

4.10.3. Kesinlik

Yöntem 3.2.10.3.'te belirtildiği şekilde çalışılarak elde edilen gün içi ve günler arası kesinlik bulguları sırasıyla Tablo 4-45 ve Tablo 4-46'da verilmektedir.

Tablo 4-45: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait gün içi kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
25	172750,33	8537,37	4,94
250	1524407,00	20167,88	1,32
1000	6162902,67	257002,49	4,17

Tablo 4-46: Takrolimusun miktar tayini yöntemine ait günler arası kesinlik bulguları (n=3)

Konsantrasyon (ng/mL)	Birinci gün	İkinci gün	Üçüncü gün	Ortalama Alan	SD (±)	RSD (%)
25	172750,33	151736,67	184896,33	169794,44	16776,29	9,88
250	1524407	1061211,33	1303689,33	1296435,89	231683,01	17,87
1000	6162902,67	5399812	5315290,67	5626001,78	466886,38	8,30

4.10.4. Derideki ve Banttaki Takrolimusun Geri Kazanımı (Doğruluk)

Yöntem 3.2.10.4.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak deri ve bantlardaki geri kazanım miktarları ve yüzdeleri ile SD değerleri Tablo 4-47 ve Tablo 4-48'de sunulmaktadır.

Tablo 4-47: Takrolimusun bant numunelerinden geri kazanımı (n=3)

Uygulanan miktar/cm^2 (ng)	Geri kazanılan miktar/cm^2 Ortalama ±SD (ng)	Geri kazanılan % Ortalama ±SD (ng)
9,45	9,61±0,54	101,71 ±5,69
47,26	41,51±5,33	87,82±11,27

(±) Standart sapma

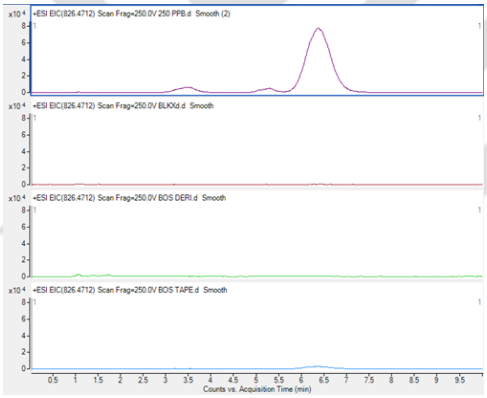
Tablo 4-48: Takrolimusun deri numunelerinden geri kazanımı (n=3)

Uygulanan miktar/cm^2 (ng)	Geri kazanılan miktar/cm^2 Ortalama ±SD (ng)	Geri kazanılan % Ortalama ±SD (ng)
9,45	8,65±0,42	91,51±4,48
47,26	45,42±11,36	96,12±24,05

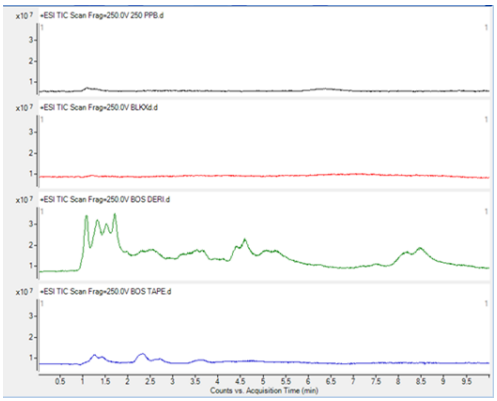
(±) Standart sapma

4.10.5. Seçicilik

Yöntem 3.2.10.5.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak etkin madde içermeyen formülasyonların, derinin ve bandın takrolimusun pikinin alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptandı. Şekil 4-19 ve Şekil 4-20'de seçicilik çalışması bulguları gösterilmektedir.



Şekil 4-19: Takrolimusun seçicilik çalışması ile elde edilen blank, boş deri, boş bant ve 250 ng/mL'lik standart çözeltilerine ait kromatogramlar (ECI'ya göre) (ECI: Extracted ion chromatogram: Ekstrakte iyon kromatogramı)



Şekil 4-20: Takrolimusun seçicilik çalışması ile elde edilen blank, boş deri, boş bant ve 250 ng/mL'lik standart çözeltilerine ait kromatogramlar (TIC'ye göre) (TIC: The total ion current chromatogram: Total iyon kromatogramı)

4.10.6. Teşhis Limiti (TL) ve Miktar Tayini Limiti (MTL)

Yöntem 3.2.10.6.'da belirtildiği şekilde yapılan çalışmalar göre TL= 0,1361 ng/mL ve MTL= 0,4124 ng/mL olarak bulundu.

4.11. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.11.'de anlatıldığı gibi etkin maddelerin yüklü olduğu antioksidan madde/ler ve koruyucu madde içeren mikroemülsiyonlar hazırlandı. Mikroemülsiyonlara ilave edilen bu yardımcı maddelerin etkinliğini araştırmak ve formülasyon içindeki optimium miktarlarını belirlemek için stabilite çalışmaları yapıldı.

İlk olarak, takrolimus ve fusidik asit yüklü, BHA ve benzoik asit eklenen mikroemülsiyon "CLT (1:2)-A" hazırlandı ve stabilitesi izlendi. Mikroemülsiyona ait stabilite çalışması bulguları Tablo 4-49 ve Tablo 4-50'de sunulmaktadır.

Tablo 4-49: CLT (1:2)-A mikromülsiyonunun stabilite çalışmasına ait ait geri kazanım (%) ve toplam safsızlık (%) bulguları

Zaman noktaları	CLT (1:2)-A		
	Geri Kazanım (%)		Toplam Safsızlık (%)
	Fusidik asit	Takrolimus	
Başlangıç	102,5	106,4	0,80
1. Ay (40C %75 RH)	99,5	87,8	1,8
2. Ay (40C %75 RH)	99,5	83,7	5,2
3. Ay (40C %75 RH)	98,0	78,4	6,8

Tablo 4-50: CLT (1:2)-A mikroemülsiyonunun stabilite çalışmasına ait damlacık boyutu ve dağılımı ile pH bulguları

Zaman noktaları	CLT (1:2)-A		
	Damlacık Boyutu (nm)	Polidispersite İndeksi (PDI)	pH
Başlangıç	4,68± 0,01	0,12 ±0,01	4,06
1. Ay (40C %75 RH)	3,40 ±0,06	0,20 ±0,01	4,10
2. Ay (40C %75 RH)	3,65± 0,08	0,22±0,00	4,18
3. Ay (40C %75 RH)	4,11 ±0,80	0,22 ±0,02	4,05

Yapılan çalışmalar doğrultusunda, formülasyonun zorlayıcı koşullara maruz bırakılması safsızlık miktarında artışa neden olmuştur. Etkin maddelerin formülasyonlardaki geri kazanım bulguları fusidik asit için uygun iken takrolimus için düşüktür. Formülasyonun fiziksel stabilitesinin değişmediği elde edilen pH ile damlacık boyutu ve dağılımı bulgularından anlaşılmaktadır.

Optimizasyon çalışmalarına 3.2.11.'de anlatıldığı gibi BHA miktarı artırılarak ve Disodyum EDTA ekenerek devam edildi. Hazırlanan "CLT (1:2)-B" mikroemülsiyonun stabilite çalışması bulguları Tablo 4-51 ve Tablo 4-52'de sunulmaktadır.

Tablo 4-51: CLT (1:2)-B mikroemülsiyonunun stabilite çalışmasına ait geri kazanım (%) ve toplam safsızlık (%)bulguları

Zaman noktaları	CLT (1:2)-B		
	Geri Kazanım (%)		Toplam Safsızlık (%)
	Fusidik asit	Takrolimus	
Başlangıç	105,5	98,6	1,7
1. Ay (40C %75 RH)	98,5	91,8	2,8
2. Ay (40C %75 RH)	98,0	89,5	3,9
3. Ay (40C %75 RH)	97,5	82,3	4,6

Tablo 4-52: CLT (1:2)-B mikromülsiyonunun stabilite çalışmasına ait damlacık boyutu ve dağılımı bulguları

Zaman noktaları	CLT (1:2)-B		
	Damlacık boyutu (nm)	Polidispersite indeksi (PDI)	pH
Başlangıç	4,88 ±0,09	0,19± 0,02	4,50
1. Ay (40C %75 RH)	4,41±0,03	0,14±0,00	4,27
2. Ay (40C %75 RH)	4,37±0,13	0,19±0,01	4,32
3. Ay (40C %75 RH)	4,41±0,06	0,16±0,02	4,32

Bir önceki çalışma bulgularına benzer şekilde formülasyonun zorlayıcı koşullara maruz bırakılması safsızlık miktarında artışa olmuştur. Ancak artan BHA ve eklenen Disodyum EDTA ile CLT (1:2)-B mikroemülsiyonunun safsızlık yüzdesinde saptanan

artışın CLT (1:2)-A'ya göre daha düşük olduğu görülmektedir. Etkin maddelerin formülasyonlardaki geri kazanım bulguları fusidik asit için uygun iken takrolimus için yine düşüktür ancak ilk çalışma verilerden daha yüksektir. Yapılan optimizasyonla formülasyon fiziksel stabilitesinin etkilenmediği elde edilen pH ile damlacık boyutu ve dağılımı bulgularından görülmektedir.

Formülasyon optimizasyon çalışmalarına yöntem 3.2.11.'de anlatıldığı gibi farklı antioksidanlar eklenerek ve birim formülasyondaki antioksidan miktarı artırılarak devam edildi.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda etkin maddelerin mikroemülsiyon içinde stabil kalabileceği antioksidan, koruyucu ve şelat yapıcı maddeler ile bunların yüzdeleri belirlendi.

Takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin bir arada yüklendiği ve optimizasyonu tamamlanan mikroemülsiyonların kodları, formülasyon bileşenleri ve yüzdeleri Tablo 4-53'te gösterilmektedir.

Tablo 4-53: Takrolimus ve Fusidik asit etkin maddelerinin bir arada yüklendiği mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzde aralıkları

Formülasyon	***Formülasyon Kodları**		
Bileşenleri	**CLT-(1:1)**	**CLT-(2:1)**	**CLT-(1:2)**
Takrolimus	0,1	0,1	0,1
Fusidik asit	2	2	2
Capryol 90	5-10	5-10	5-10
Labrasol	25-35	30-40	15-20
Transcutol P	25-35	15-20	25-35
Su	25-35	35-45	35-45
Benzoik asit	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2
BHA	0,01-0,02	0,01-0,02	0,01-0,02
BHT	0,01-0,1	0,01-0,1	0,01-0,1
Vitamin E	0,01-0,05	0,01-0,05	0,01-0,05
Sodyum EDTA	0,01-0,05	0,01-0,05	0,01-0,05

(*) Tabloda yer alan formülasyonlar SanTez projesi kapsamından hazırlanmış olup CLT-(1:2) mikroemülsiyonu için patent başvurusu yapılmıştır. Bu nedenle formülasyonların bileşenlerinin yüzde değerleri aralık olarak sunulmaktadır (Patent başvuru numaraları; TR201510399 ve TR201513223).

4.12. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyonların Optimizasyonu Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.12.'de anlatıldığı gibi takrolimus yüklü mikroemülsiyonlar hazırlandı. Etkin madde takrolimusun moleküler yapısının oksidasyona açık grupların olması nedeniyle formülasyonlara antioksidan madde ayrıca mikrobiyal üremeye karşı antimikrobiyal koruyucu madde eklendi. Hangi yardımcı maddelerin hangi miktarlarda ekleneceğine Bulgu 4.11. 'de saptanan çıktılara göre karar verildi.

Takrolimus yüklenen ve optimizasyonu tamamlanan mikroemülsiyonların kodları, formülasyon bileşenleri ve yüzdeleri Tablo 4-54'te gösterilmektedir.

Tablo 4-54: Takrolimus yüklenen mikroemülsiyonlara ait formülasyon bileşenlerinin yüzde aralıkları

Formülasyon Bileşenleri	(*) Formülasyon Kodları			
	OLT-CEL	OLT	OTT-PEG	OTT
Takrolimus	0,1	0,1	0,1	0,1
Oleik asit	5,8	6,7	5,8	6,7
Labrasol	17,6	30,4	-	-
Kolliphor EL	8,2	-	-	-
Tween 20	-	-	17,6	30,4
Transcutol P	25,8	30,4	26,4	30,4
PEG 400	-	-	8,8	-
Su	42,18	32,08	40,98	32,08
Benzoik asit	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2
BHA	0,01-0,02	0,01-0,02	0,01-0,02	0,01-0,02
BHT	0,01-0,1	0,01-0,1	0,01-0,1	0,01-0,1
Vitamin E	0,01-0,05	0,01-0,05	0,01-0,05	0,01-0,05
Sodyum EDTA	0,01-0,05	0,01-0,05	0,01-0,05	0,01-0,05

(*) Tabloda yer alan formülasyonlardan katı yardımcı maddelerin yüzdeleri SanTez projesi kapsamından hazırlanan ve patent başvurusu yapılan CLT-(1:2) mikroemülsiyonu ile aynı olduğu için formülasyonların bileşenlerinin yüzde değerleri aralık olarak sunulmaktadır (Patent başvuru numaraları; TR201510399 ve TR201513223).

4.13. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Merhemlerin Optimizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.13.'te anlatıldığı gibi MR-TC-5 merhem formülasyonu etkin maddeler takrolimus ve fusidik asit yüklenerek hazırlandı. Merhem formülasyonunun

stabilitesi 3 ay süreyle 40±2˚C, %75±5 koşulunda izlendi. Kimyasal ve fiziksel stabilite çalışmasına ait bulgular Tablo 4-55'te sunulmaktadır.

Tablo 4-55: Takrolimus ve fusidik asit yüklü MR-TC-5 kodlu merhem formülasyonuna ait stabilite bulguları

Zaman noktaları	MR-TC-5			
	Geri Kazanım (%)		Toplam safsızlık (%)	pH
	Fusidik asit	Takrolimus		
Başlangıç	101,5	103,1	1,8	6,36
1. Ay (40C %75 RH)	100,5	85,8	2,1	6,42
2. Ay (40C %75 RH)	91,0	74,6	4,5	6,47
3. Ay (40C %75 RH)	90,0	70,8	4,9	6,35

Elde edilen sonuçlara göre etkin maddelerin geri kazanımlarında azalma olduğu ve safsızlık miktarında ise artış olduğu görüldü. Bu durumun formülasyon bileşimine antioksidan eklenmemesinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca, takrolimustaki azalmanın daha fazla olması, hazırlama aşamasında çözücü amaçlı kullanılan yardımcı maddelere uygulanan prosesten dolayı olabileceği sonucuna varıldı.

Bu çıktılar doğrultusunda, yöntem 3.2.13.'te belirtildiği gibi MR-TC-5 formülasyon bileşimine BHA ve katı parafin eklenerek, sıvağ yüzdesi ayarlanarak, hazırlama prosesi değiştirilerek, takrolimus ve fusidik asit yüklenen MR-TC-8 kodlu merhem formülasyonu hazırlandı. Çözücüsü Triasetin olan MR-TA-5 kodlu merhem formülasyonu ise etkin maddeler yüklenerek ve BHA eklenerek hazırlandı. Merhemlerin 1 ay süreyle 40±2˚C, %75±5 koşulunda izlenen stabilite bulguları Tablo 4-56 ve Tablo 4-57 sunulmaktadır.

Tablo 4-56: Takrolimus ve fusidik asit yüklü MR-TC-8 kodlu merhem formülasyonuna ait stabilite bulgular

	MR-TC-8			
Zaman noktaları	Geri Kazanım (%)		Toplam safsızlık (%)	pH
	Fusidik asit	Takrolimus		
Başlangıç	104,5	99,0	1,0	5,78
1. Ay (40C %75 RH)	100,5	88,5	2,1	5,77

Tablo 4-57: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü MR-TA-5 kodlu merhem formülasyonuna ait stabilite bulguları

MR-TA-5				
Zaman noktaları	**Geri Kazanım (%)**		**Toplam safsızlık (%)**	**pH**
	Fusidik asit	**Takrolimus**		
Başlangıç	103,0	98,9	1,3	5,85
1. Ay (40C %75 RH)	99,5	93,1	1,5	5,90

Elde edilen sonuçlara göre etkin maddelerin, her iki merhem formülasyonunda (MR-TC-8 ve MR-TA-5) da geri kazanımlarında azalma olduğu ancak söz konusu azalmanın bir önceki merhem formülasyonuna (MR-TC-5) göre daha düşük olduğu görüldü. Dolayısıyla yapılan optimizasyon sayesinde etkin maddelerin stabilitelerinde artış sağlandığı sonucuna varıldı.

Yöntem 3.2.13.'te belirtildiği üzere, formülasyon optimizasyon çalışmalarına formülasyona farklı antioksidanlar (BHT ve Vitamin E) eklenerek ve/veya formülasyon bileşenlerinin yüzde miktarları değiştirilerek devam edildi. Bu kapsamda çözücüsü Transcutol P ile Capryol 90 olan "MR-TC-9" ile çözücüsü Propilen karbonat olan "MR-PC-6" kodlu iki merhem formülasyonu hazırlandı. Optimizasyonu tamamlanan bu formülasyonların yüzde bileşenleri (%) Tablo 4-58'te gösterilmektedir.

Tablo 4-58: Optimizasyonu tamamlanan merhem formülasyonlarının bileşenleri ve yüzde değerleri

Formülasyon Bileşenleri	*Formülasyon yüzdeleri	
	MT-TC-9	**MR-PC-6**
Takrolimus	0,1	0,1
Fusidik asit	2	2
Capryol 90	5-15	-
Transcutol P	5-15	-
Propilen karbonat	-	5-10
Sıvı parafin	15-25	45-55
Katı parafin	10-20	5-15
Vazelin	25-35	25-35
Balmumu	4-10	4-10
BHA	0,01-0,02	0,01-0,02
BHT	0,01-0,1	0,01-0,1
Vitamin E	0,01-0,05	0,01-0,05

(*) Tabloda formülasyon bileşeni verilen Merhem SanTez projesi kapsamından hazırlanmış olup formülasyon için patetent başvurusu yapılmıştır. Bu nedenle formülasyon bileşenlerinin yüzde değerleri aralık olarak sunulmaktadır (patent başvuru numarası TR201510398).

4.14. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Mikroemülsiyonlar fiziksel görünüş, refraktif indeks, pH, iletkenlik, damlacık boyutu, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, viskozite ve fiziksel stabilite açısından değerlendirildi ve polarize ışık mikroskop ile incelendi. Mikroemülsiyonların hacim fraksiyonları hesaplandı.

4.14.1. Fiziksel Görünüş

Yöntem 3.2.14.1.'de anlatıldığı gibi, mikroemülsiyonlar görsel açıdan değerlendirildi. Mikroemülsiyonlardan yağ fazı Capryol 90 olan formülasyonların renksiz, saydam ve homojen görünümlü olduğu ve yağ fazı oleik asit olan formülasyonların kullanılan yağdan dolayı sarımtrak renkte, saydam ve homojen görünümlü olduğu gözlendi. Mikroemülsiyonlarda bulanıklık ve faz ayrımı görülmedi.

4.14.2. Refraktif İndeks (RI)

Yöntem 3.2.14.2.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların RI ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 4-59 ve 4-60'ta verilmektedir.

Tablo 4-59: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların refraktif indeks değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Refraktif indeks	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü mikroemülsiyonlar
CLT-(1:2)	1,404±0,00	1,404±0,00
CLT-(1:1)	1,409±0,00	1,409±0,00
CLT-(2:1)	1,415±0,00	1,415±0,00

Tablo 4-60: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların ait refraktif indeks değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Refraktif indeks	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
OLT-CEL	1,405±0,00	1,405±0,00
OLT	1,415±0,00	1,415±0,00
OTT-PEG	1,410±0,00	1,410±0,00
OTT	1,418±0,00	1,418±0,00

4.14.3. pH

Yöntem 3.2.14.3.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların pH ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 4-61 ve 4-62'de verilmektedir.

Tablo 4-61: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların pH değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	pH	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
CLT-(1:2)	4,58±0,05	4,34±0,02
CLT-(1:1)	4,97±0,08	4,71±0,03
CLT-(2:1)	4,25±0,07	4,09±0,03

Tablo 4-62: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların pH değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	pH	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
OLT-CEL	4,37±0,07	4,41±0,02
OLT	4,39±0,04	4,42±0,07
OTT-PEG	4,90±0,15	4,92±0,10
OTT	5,11±0,13	5,21±0,06

4.14.4. İletkenlik

Yöntem 3.2.14.4.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların elektriksel iletkenlik ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 4-63 ve 4-64'te verilmektedir.

Tablo 4-63: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların iletkenlik değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	İletkenlik (µS/cm)	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
CLT-(1:2)	20,12±0,08	19,52±0,07
CLT-(1:1)	13,53±0,15	12,23±0,10
CLT-(2:1)	25,46±0,24	23,72±0,13

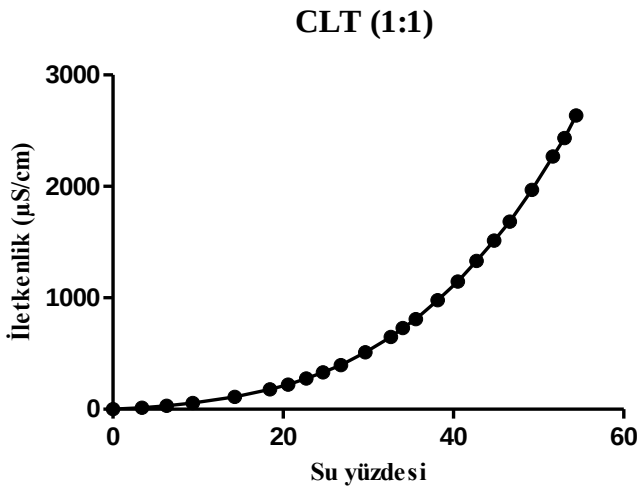
Tablo 4-64: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların iletkenlik değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	İletkenlik (µS/cm)	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
OLT-CEL	37,57±0,43	37,02±0,48
OLT	18,10±0,16	17,30±0,10
OTT-PEG	49,85±1,38	49,17±4,24
OTT	45,38±0,57	44,87±0,12

Mikroemülsiyon formülasyonlarının iletkenliğinin % 0,9 NaCI çözeltisi ile değerlendirmesi yöntem 3.2.14.4'te anlatıldığı gibi çalışıldı. Çalışma bulguları Tablo 4-65 ile Tablo 4-71 aralığında ve Şekil 4-21 ile Şekil 4-27 aralığında sunulmaktadır.

Tablo 4-65: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları (n=3)

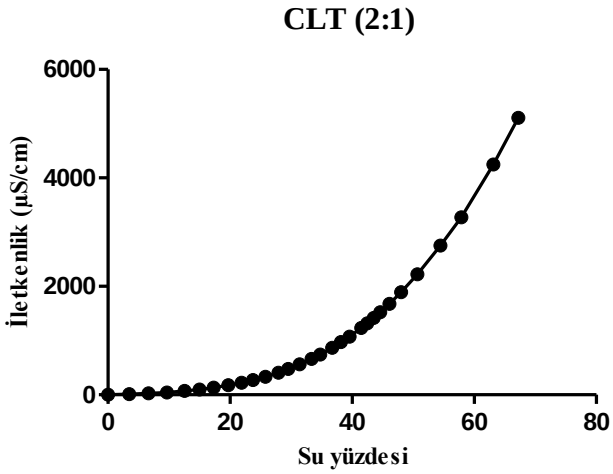
CLT (1:1)		
Su yüzdesi	**İletkenlik (µS)**	**SD (±)**
0,00	1,41	0,01
3,40	14,67	0,05
6,32	31,03	0,05
9,37	55,15	0,16
14,30	110,63	0,65
18,44	178,57	0,45
20,57	220,03	0,72
22,71	275,50	0,35
24,69	330,17	0,60
26,80	396,17	1,96
29,66	510,23	1,80
32,66	647,67	3,59
34,05	727,77	2,08
35,57	809,80	0,89
38,14	978,47	1,44
40,51	1147,00	5,35
42,73	1331,67	3,06
44,79	1513,00	2,00
46,63	1684,33	5,77
49,23	1968,67	3,21
51,68	2268,67	13,32
53,05	2434,33	8,02
54,41	2635,00	13,00



Şekil 4-21: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri

Tablo 4-66: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları (n=3)

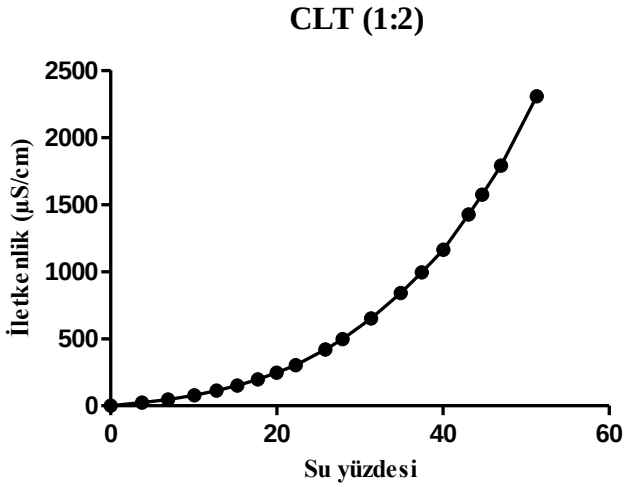
CLT (2:1)		
Su yüzdesi	**İletkenlik (µS)**	**SD**
0,00	1,07	0,01
3,49	11,24	0,06
6,63	25,21	25,21
9,65	44,66	0,12
12,55	70,41	0,10
15,00	97,64	0,35
19,73	175,83	0,65
21,90	221,83	0,40
23,74	270,20	0,36
25,78	330,30	0,46
27,92	406,50	1,31
31,39	561,60	1,54
34,79	744,73	2,74
36,75	869,40	0,95
38,16	972,17	1,01
41,49	1232,67	0,58
43,55	1417,67	4,16
46,12	1676,33	1,53
48,02	1893,67	4,51
50,68	2223,33	11,72
54,45	2753,67	7,09
57,87	3274,67	41,19
63,13	4247,33	9,07
67,24	5107,33	10,69



Şekil 4-22: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 2:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri

Tablo 4-67: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:2 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları devamı (n=3)

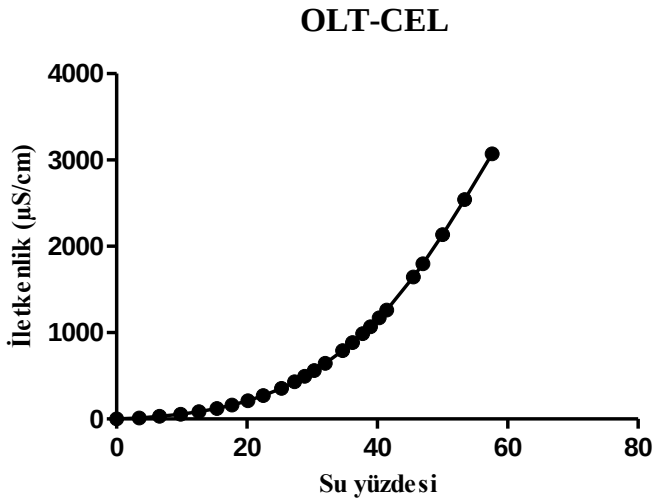
CLT (1:2)		
Su yüzdesi	**İletkenlik (µS)**	**SD (±)**
0,00	1,59	0,01
3,80	22,98	0,32
6,92	46,72	0,55
10,09	77,33	0,10
12,76	114,47	0,38
15,26	151,77	0,35
17,73	196,40	0,92
19,99	246,17	1,35
22,28	303,77	0,74
25,84	420,70	0,78
27,92	496,80	1,06
31,35	650,60	3,70
34,91	839,93	2,50
37,44	993,83	3,82
40,05	1163,53	3,01
43,07	1425,67	3,51
44,70	1573,67	5,03
46,97	1790,00	7,94
51,28	2307,00	52,68



Şekil 4-23: Yağ fazı Capryol 90, Labrasol:Transcutol P oranı 1:2 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri

Tablo 4-68: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları (n=3)

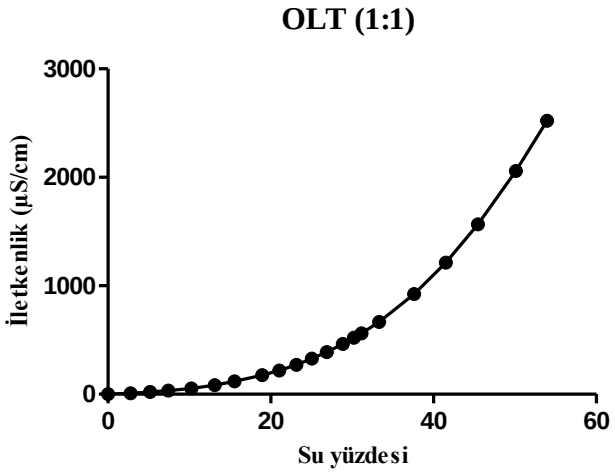
OLT-CEL		
Su yüzdesi	**İletkenlik (µS)**	**SD**
0,00	1,79	0,03
3,47	13,29	0,07
6,62	30,07	0,02
9,83	53,96	0,25
12,66	84,06	0,16
15,40	121,20	0,35
17,69	160,70	0,44
20,14	212,30	0,35
22,50	271,23	0,92
25,31	355,73	0,32
27,31	430,97	1,71
28,85	495,63	0,78
30,35	561,00	1,51
32,04	645,07	1,85
34,67	790,90	1,48
36,19	885,70	1,41
38,96	1069,33	2,31
40,28	1171,33	2,31
41,45	1261,33	2,52
45,55	1644,67	0,58
46,98	1799,33	0,58
50,02	2135,67	5,03
53,42	2541,67	6,03
57,64	3071,00	5,00



Şekil 4-24: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol- Kolliphor EL:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümler

Tablo 4-69: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları (n=3)

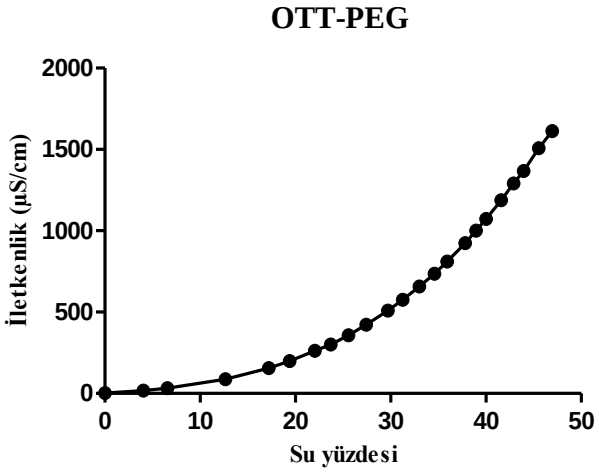
OLT		
Su yüzdesi	**İletkenlik (µS)**	**SD**
0,00	1,01	0,02
2,77	9,25	0,04
5,20	20,05	0,04
7,40	32,73	0,04
10,24	54,36	0,18
13,10	84,58	0,44
15,56	117,57	0,72
18,95	175,20	0,82
21,05	219,33	0,47
23,15	271,73	1,46
25,05	328,27	2,30
26,89	389,70	2,57
28,85	464,13	1,99
30,23	520,83	2,90
31,15	560,57	1,86
33,33	666,10	2,17
37,62	924,43	2,80
41,50	1214,67	5,77
45,46	1565,33	2,52
50,11	2059,67	18,15
53,96	2522,00	10,58



Şekil 4-25: Yağ fazı Oleik ait, Labrasol :Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri

Tablo 4-70: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları (n=3)

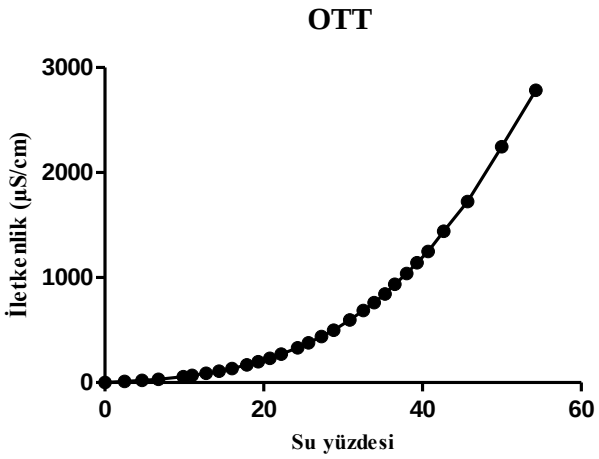
OTT-PEG		
Su yüzdesi	**İletkenlik (µS)**	**SD**
0,00	2,83	0,03
4,04	16,78	0,02
6,58	32,10	0,07
12,64	88,09	0,46
17,21	155,87	0,59
19,40	198,93	1,15
22,04	263,00	1,35
23,72	300,77	2,54
25,57	358,27	2,20
27,42	421,73	2,78
29,72	509,30	2,85
31,27	576,13	1,40
33,02	656,67	4,13
34,59	735,67	3,26
35,92	810,70	2,88
37,81	924,50	2,93
38,96	1001,53	3,93
40,02	1071,67	3,21
41,60	1188,00	3,00
42,91	1290,67	6,03
43,95	1368,00	3,61
45,55	1507,33	3,79
46,96	1612,00	2,65



Şekil 4-26: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P-PEG 400 oranı 1:2 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümler

Tablo 4-71: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarları ile ölçülen iletkenlik değerleri bulguları (n=3)

OTT		
Su yüzdesi	**İletkenlik (µS)**	**SD**
0,00	2,49	0,01
2,49	10,68	0,03
4,67	20,36	0,04
6,74	31,90	0,10
9,88	57,25	0,23
10,99	67,62	0,14
12,75	87,71	0,30
14,38	108,53	0,47
16,01	134,40	0,80
19,31	198,07	0,29
22,22	272,17	1,25
25,66	377,50	0,53
27,30	439,40	1,48
30,84	596,77	1,63
32,55	687,17	3,61
35,30	843,97	0,29
36,53	935,30	7,97
38,01	1039,67	2,08
40,71	1248,33	8,14
42,68	1440,67	22,37
45,69	1723,33	10,07
49,99	2246,67	17,79
54,29	2783,33	15,01



Şekil 4-27: Yağ fazı Oleik ait, Tween 20:Transcutol P oranı 1:1 olan mikroemülsiyonun eklenen su fazı miktarlarına karşı değişen iletkenlik ölçümleri

4.14.5. Damlacık Boyutu ve Polidispersite İndeksi

Yöntem 3.2.14.5.'te anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve PDI ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 4-72 ve 4-73'te verilmektedir.

Tablo 4-72: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların PS ve PDI değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Boş Mikroemülsiyonlar		Yüklü Mikroemülsiyonlar	
	Damlacık boyutu (nm)	PDI	Damlacık boyutu (nm)	PDI
CLT-(1:2)	4,198±0,017	0,103±0,015	4,668±0,019	0,093±0,017
CLT-(1:1)	2,503±0,016	0,265±0,025	2,713±0,018	0,283±0,027
CLT-(2:1)	6,756±0,019	0,134±0,021	7,176±0,021	0,145±0,023

Tablo 4-73: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların PS ve PDI değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Boş Mikroemülsiyonlar		Yüklü Mikroemülsiyonlar	
	Damlacık boyutu (nm)	PDI	Damlacık boyutu (nm)	PDI
OLT-CEL	6,590±0,075	0,209±0,007	6,820±0,086	0,219±0,006
OLT	4,290±0,265	0,185±0,048	4,180±0,276	0,180±0,037
OTT-PEG	7,706±0,029	0,251±0,008	7,924±0,018	0,248±0,007
OTT	4,164±0,480	0,528±0,218	4,074±0,590	0,530±0,109

4.14.6. Zeta Potansiyeli

Yöntem 3.2.14.6.'da anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların zeta potansiyeli ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 4-74 ve 4-75'te verilmektedir.

Tablo 4-74: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların zeta potansiyeli değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Zeta potansiyeli (mV)	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
CLT-(1:2)	-0,110±0,331	-0,098±0,232
CLT-(1:1)	-0,120±0,672	-0,028±0,463
CLT-(2:1)	-0,513±0,533	-0,556±0,443

Tablo 4-75: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların zeta potansiyeli değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Zeta potansiyeli (mV)	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
OLT-CEL	0,170±0,453	0,130±0,564
OLT	0,045±0,230	0,033±0,110
OTT-PEG	-0,078±0,210	-0,069±0,140
OTT	0,049±0,358	0,038±0,169

4.14.7. Viskozite

Yöntem 3.2.14.7.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların viskozite ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçları Tablo 4-76 ve 4-77'de verilmektedir.

Tablo 4-76: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların viskozite değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Viskozite (cp)	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
CLT-(1:2)	17,89±0,06	18,39±0,04
CLT-(1:1)	26,03±0,11	25,16±0,09
CLT-(2:1)	20,69±0,05	21,48±0,03

Tablo 4-77: Takrolimus yüklü mikroemülsiyonların viskozite değerleri (n=3)

Formülasyon kodu	Viskozite (cp)	
	Boş Mikroemülsiyonlar	Yüklü Mikroemülsiyonlar
OLT-CEL	32,14±0,27	33,64±0,16
OLT	29,45±0,15	28,33±0,04
OTT-PEG	46,05±0,19	44,55±0,08
OTT	54,06±3,46	55,62±2,57

4.14.8. Fiziksel stabilite

Yöntem 3.2.14.8.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların stabiliteleri araştırıldı. Santrifüj işlemi sonucunda mikroemülsiyonlarda faz ayrımı gözlenmedi. Daha sonra mikroemülsiyonlara dondurma-çözme döngüsü uygulanarak sıcaklık testi gerçekleştirildi. Formülasyonlarda faz ayrımı oluşmadı ve homojenitede bir değişiklik gözlenmedi.

4.14.9. Polarize Işık Mikroskobu

Yöntem 3.2.14.9.'da anlatıldığı şekilde çalışıldı. Mikroemülsiyonlar çapraz polarize ışık altında Leica 5x Pol mercek ile incelenerek karanlık görüntüler elde edildi.

4.14.10. Hacim Fraksiyonunun Belirlenmesi

Yöntem 3.2.14.10.'da belirtildiği gibi her formülasyonun hacim fraksiyonu (Φ) hesaplandı. CLT (1:1) CLT (2:1) ve CLT (1:2) formülasyonlarını Φ değerleri sırasıyla 0,37; 0,41 ve 0,23 olarak hesaplandı. OLT-CEL ve OTT-PEG için Φ değeri 0,23 olarak, OLT ve OTT için 0,37 olarak bulundu.

4.15. Mikroemülsiyonlardan Etkin Maddelerin *In Vitro* Deriden Penetrasyon Çalışmalarına Çalışmalarına Ait Bulgular

Formülasyonların uygulanmasını takiben, derinin tabakalarında biriken takrolimus ve fusidik asit miktarlarını değerlendirmek için Yöntem 3.2.15.'te anlatıldığı gibi *in vitro* koşullarda deriden penetrasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Takrolimus ve fusidik asit yüklü CLT (1:1), CLT (2:1), CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyonlar ile takrolimusun piyasa preparatı Protopic® merhemin ve fusidik asitin piyasa preparatı Fucidin® kremin 12 saat süre ile domuz derisine uygulanması sonrasında, *stratum corneum* ve canlı *epidermis+dermis* tabakalarında biriken takrolimus ve fusidik asit miktarları Tablo 4-78 ve Tablo 4-79'da verilmektedir. Ayrıca sadece takrolimus yüklü OLT-CEL, OLT, OTT-PEG, OTT kodlu mikroemülsiyonlar ile takrolimusun piyasa Protopic® merhemin 12 saat uygulanması sonrasında dermal tabakalarda saptanan takrolimus miktarları Tablo 4-80'de verilmektedir.

*Stratum corneum'*da ve canlı *epidermis+dermis* tabakakalarında saptanan takrolimus ile fusidik asit miktarlarının karşılaştırılmasının yapıldığı grafikler sırasıyla Şekil 4-28 ve Şekil 4-29; ayrıca takrolimusun aynı tabakalardaki miktarlarının karşılaştırılmasının yapıldığı grafik Şekil 4-30'da sunulmaktadır.

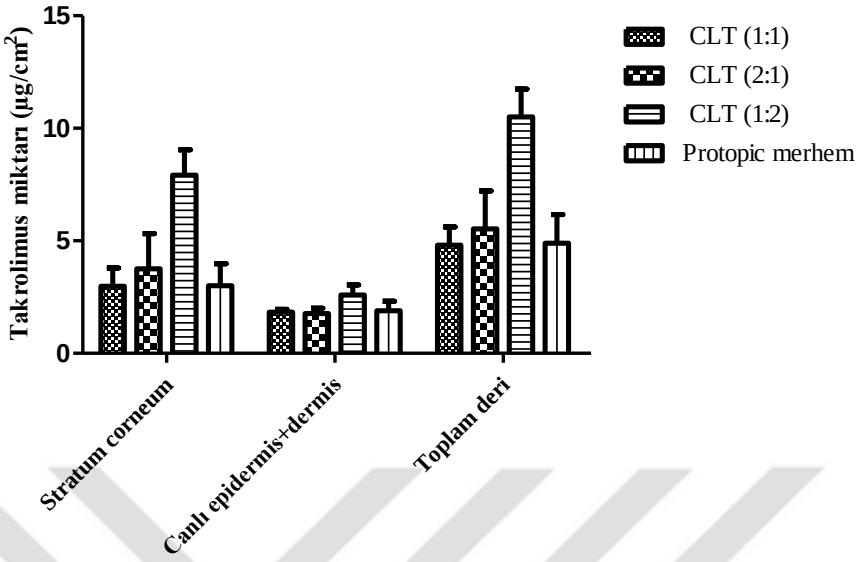
In vitro penetrayon çalışmaları sonunda, takrolimusun ile fusidik asidin deriden geçişlerinin değerlendirilmesi için reseptör fazdan (PBS pH 7,4) örnek alındı ve analizi yapıldı. Her iki etkin madde de reseptör fazda kullanılan analitik yöntem ile tespit edilemedi. Analitik yöntemin her iki etkin madde için teşhis limitleri dikkate alındığında takrolimus ≤0,1 µg/mL ve fusidik asit ≤ 0,5 µg/mL olarak değerlendirildi.

Tablo 4-78: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatları ile gerçekleştirilen 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asit miktarları

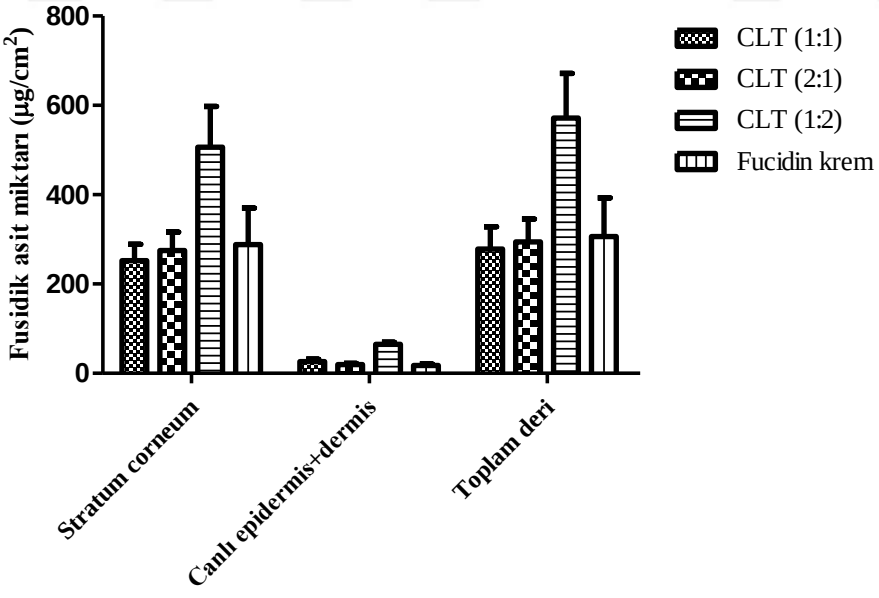
Formülasyon kodu	Takrolimus (µg/cm²)		Fusidik asit (µg/cm²)	
	Stratum corneum	Canlı *epidermis dermis*	*Stratum corneum*	Canlı *epidermis dermis*
CLT (1:1)	2,98±0,81	1,83±0,12	252,25 ±36,64	26,22±5,46
CLT (2:1)	3,76±1,56	1,77±0,23	274,99 ±41,25	19,53±2,57
CLT (1:2)	7,92±1,12	2,59±0,45	506,27 ±91,47	65,07± 4,27
Protopic® merhem	3,00±0,98	1,89±0,43	-	-
Fucidin® krem	-	-	288,66 ±81,75	17,72±3,29

Tablo 4-79: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatları ile gerçekleştirilen 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asidin toplam miktarları

Formülasyon kodu	Takrolimus (µg/cm²)	Fusidik asit (µg/cm²)
	Toplam deri	Toplam deri
CLT (1:1)	4,81±0,81	278,47±49,63
CLT (2:1)	5,53±1,69	294,52±51,12
CLT (1:2)	10,51±1,23	571,34±100,07
Protopic® merhem	4,89±1,28	-
Fucidin® krem	-	306,37±86,59



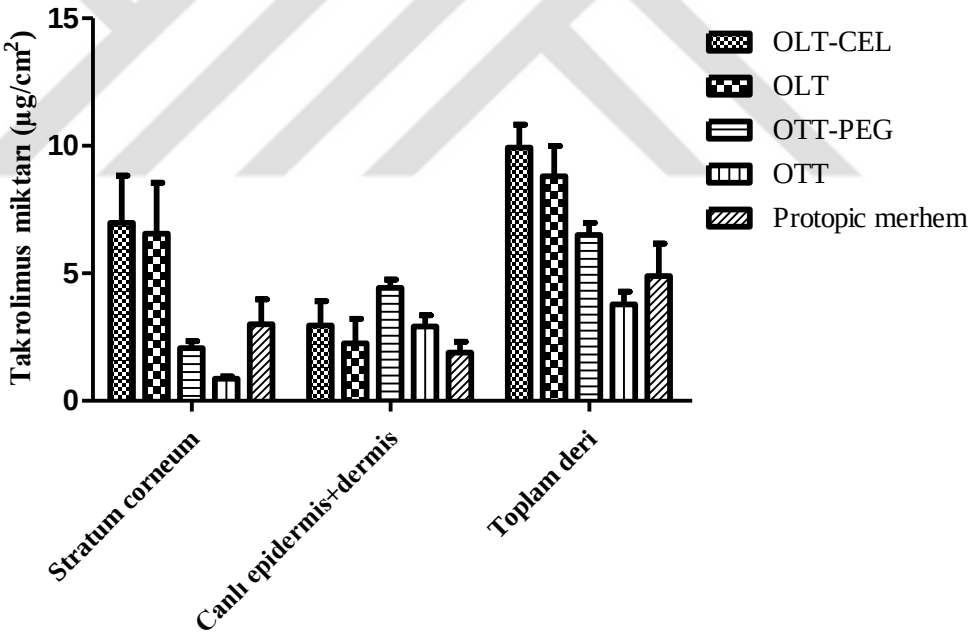
Şekil 4-28: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ile piyasa preparatının (Protopic® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben takrolimusun deri tabakalarındaki birikim miktarları



Şekil 4-29: Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ile piyasa preparatının (Fucidin® krem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben fusidik asitin deri tabakalarındaki birikim miktarları

Tablo 4-80: Takrolimus yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatı ile gerçekleştirilen 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmasını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus miktarı

Formülasyon kodu	Takrolimus (µg/cm^2)		
	Stratum corneum	Canlı *epidermis* *dermis*	Toplam deri
OLT-CEL	6,98±1,85	2,95±0,96	9,93±0,90
OLT	6,55±2,00	2,26±0,96	8,81±1,18
OTT-PEG	2,07±0,28	4,43±0,32	6,50±0,48
OTT	0,87±0,09	2,92±0,44	3,78±0,50
Protopic® merhem	3,00±0,98	1,89±0,43	4,89±1,28



Şekil 4-30: Takrolimus yüklü mikroemülsiyon formülasyonları ve piyasa preparatının (Protopic® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben takrolimusun deri tabakalarındaki birikim miktarları

4.16. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların ATR-FTIR (Azaltılmış Toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmalarına Ait Bulgular

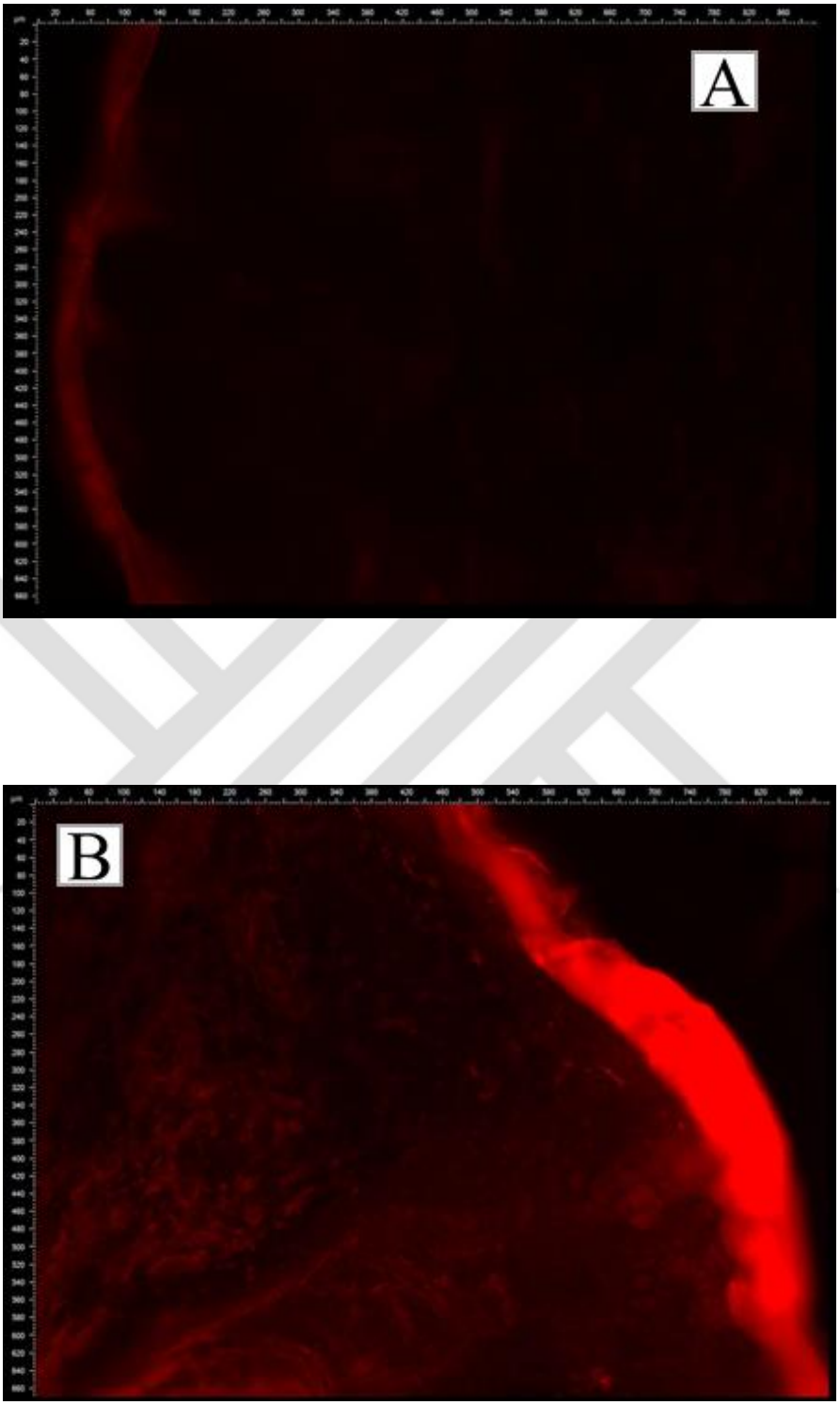
ATR-FTIR çalışması Yöntem 3.2.16.'da anlatıldığı gibi çalışıldı. *In vitro* penetrasyon çalışması ile 12 saat sonra CH_2 asimetrik (2920 cm^{-1}) ve simetrik (2850 cm^{-1}) gerilme bantlarındaki değişimleri Tablo 4-81'de verilmektedir.

Tablo 4-81: ATR-FTIR sonuçlarına göre bant değişimleri

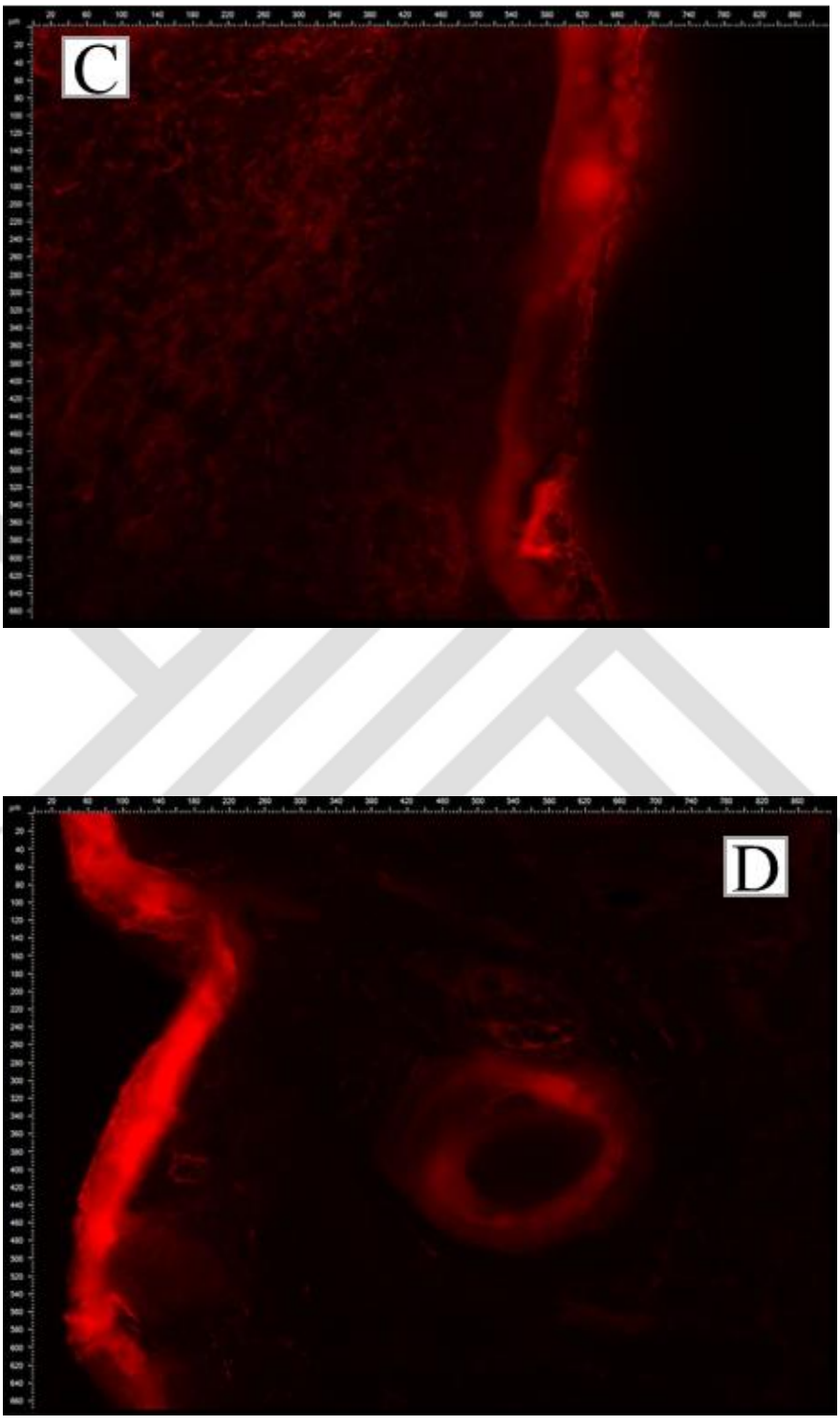
Formülasyon Kodu	CH_2 asimetrik gerilme bandı (cm^{-1})	CH_2 simetrik gerilme bandı (cm^{-1})
CLT (1:1)	2922,14±2,54	2852,87 ±2,14
CLT (2:1)	2919,54 ±1,19	2853,42 ±3,22
CLT (1:2)	2923,54 ±0,35	2854,38 ±2,16
OLT-CEL	2923,22 ±1,65	2853,65 ±2,39
OLT	2923,12 ±0,54	2855,53 ±0,25
OTT-PEG	2921,28 ±0,11	2853,12 ±0,02
OTT	2920,63 ±1,68	2852,10 ±1,74
Protopic® merhem	2918,64±0,23	2850,10 ±0,22
Fucidin® krem	2918,34±0,73	2850,36 ±0,32
Kontrol derisi	2919,31 ±0,18	2851,54 ±0,21

4.17. Nil Kırmızı Yüklü Mikroemülsiyonların Derinin Tabakalarındaki Penetrasyonun Konfokal Mikroskop Görüntüleme Tekniği (CLSM) ile İncelenmesi Çalışmalarına Ait Bulgular

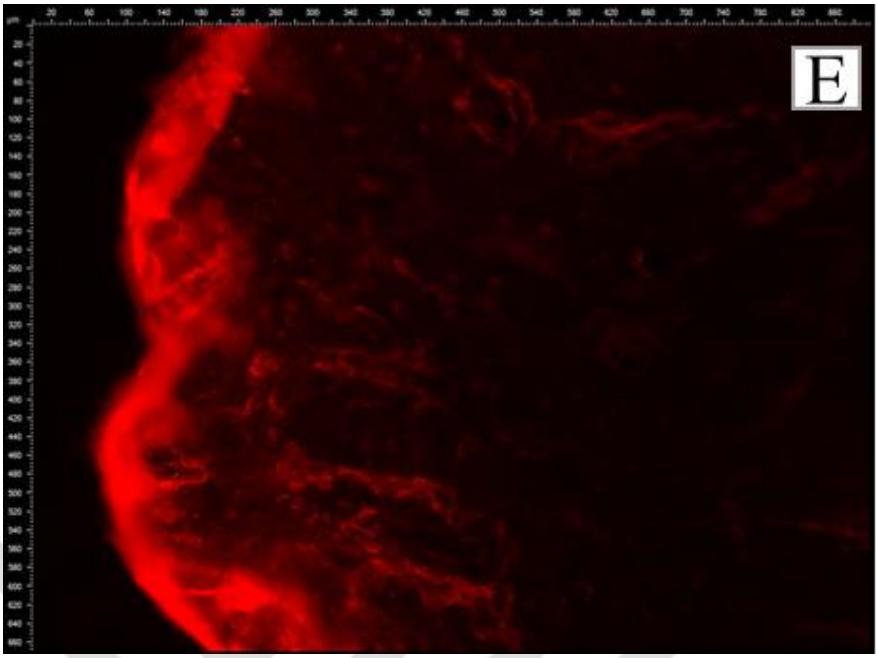
In vitro penetrasyon çalışmaları verileri dikkate alınarak takrolimus ve fusidik asit yüklü, en yüksek deri penetrasyonuna sahip CLT (1:2) mikroemülsiyonunun yayılabilirliği yöntem 3.2.17.'de anlatıldığı gibi çalışıldı ve CLSM ile gösterildi. Takrolimus yüklü mikroemülsiyonlardan ise toplam deri penetrasyonu en yüksek olan OLT-CEL ve derin deri tabakalarındaki penetrasyonu en yüksek olan OTT-PEG mikroemülsiyonlarının yayılabilirliği aynı şekilde çalışılarak gösterildi. Çalışma bulguları Şekil 4-31'de sunulmaktadır.



Şekil 4-31: Nil kırmızı yüklü CLT (1:2), OLT-CEL ve OTT-PEG mikroemülsiyonları ile PBS süspansiyonunun uygulandığı domuz derilerinin xz ekseninde alınan kesitlerine ait CLSM görüntüleri A) Nil kırmızısı yüklü PBS süspansiyonu uygunan deriye ait görüntü **B)** Nil kırmızısı yüklü CLT (1:2) mikroemülsiyonu uygunan deriye ait görüntü



Şekil 4-31: Nil kırmızı yüklü CLT (1:2), OLT-CEL ve OTT-PEG mikroemülsiyonları ile PBS süspansiyonunun uygulandığı domuz derilerinin xz ekseninde alınan kesitlerine ait CLSM görüntüleri C) Nil kırmızısı yüklü OLT-CEL mikroemülsiyonu uygunan deriye ait görüntü **D)** Nil kırmızısı yüklü OTT-PEG mikroemülsiyonu uygunan deride kıl kökünde birikime ait görüntü



Şekil 4-31: Nil kırmızı yüklü CLT (1:2), OLT-CEL ve OTT-PEG mikroemülsiyonları ile PBS süspansiyonunun uygulandığı domuz derilerinin xz ekseninde alınan kesitlerine ait CLSM görüntüleri E) Nil kırmızısı yüklü OTT-PEG mikroemülsiyonu uygunan deriye ait görüntü

4.18. Etkin Madde Yüklü Mikroemülsiyonların Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Yöntem 3.2.18.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak mikroemülsiyonların fiziksel ve kimyasal stabilitesi değerlendirildi.

4.18.1. Takrolimus ve Fusidik Asit Yüklü Mikromeülsiyon Formülasyonunun Stabilitesinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Takrolimus ve fusidik asit yüklü CLT (1:1) CLT (2:1) ve CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyonların *in vitro* deriden penetrasyon çalışması bulguları dikkate alınarak, derideki birikimi her iki etkin madde için de daha yüksek olan CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyonun stabilitesi 2-8°C sıcaklık 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem (RH) ; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nem (RH), 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nem (RH) koşullarında olmak üzere 6 ay süre ile izlendi. Formülasyona ait başlangıç verileri Tablo 4-82'de ve stabilite bulguları Tablo 4-83 ile Tablo 4-92 aralığında sunulmaktadır.

Tablo 4-82: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun geri kazanım, toplam safsızlık ve fiziksel özelliklerine ait başlangıç bulguları

İncelenen özellikler	Başlangıç Bulguları
Geri kazanım-Fusidik asit (%)	102,5
Geri kazanım-Takrolimus (%)	97,5
Toplam Safsızlık (%)	1,3
Viskozite (cP)	18,39 ±0,04
İletkenlik (µS/cm)	19,52 ±0,07
pH	4,34 ±0,02
Damlacık boyutu (nm)	4,67±0,02
PDI	0,093±0,017
Zeta potansiyeli (mV)	-0,098±0,232
Refraktif indeks	1,404±0,00

Tablo 4-83: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasının takrolimus için geri kazanım bulguları (%)

CLT (1:2)				
Takrolimus Geri Kazanım (%)				
Zaman Noktaları	2-8°C	25°C %60 RH	30°C %65 RH	40°C %75 RH
1. Ay	96,6	96,5	94,6	89,5
2. Ay	93,2	91,6	91,2	89,1
3. Ay	92,1	90,4	89,0	79,8
6. Ay	97,3	97,0	92,4	66,0

Tablo 4-84: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasının fusidik asit için geri kazanım bulguları (%)

CLT (1:2)				
Fusidik asit Geri Kazanım (%)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	99,5	99,5	99,0	98,5
2. Ay	101,0	100,5	100,0	99,0
3. Ay	99,5	98,5	99,5	100,0
6. Ay	101,5	101,5	100,0	98,0

Tablo 4-85: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait toplam safsızlık bulguları (%)

CLT (1:2)				
Toplam Safsızlık (%)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	1,5	1,8	2,0	3,3
2. Ay	1,4	1,8	2,2	4,5
3. Ay	0,86	1,3	2,1	4,9
6. Ay	1,1	2,5	3,5	9,3

Tablo 4-86: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait viskozite bulguları (cP)

CLT (1:2)				
Viskozite (cP)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	18,76	19,32	15,18	17,88
2. Ay	14,22	14,77	12,36	16,66
3. Ay	20,09	21,45	20,64	19,53
6. Ay	19,5	19,1	16,4	16,5

Tablo 4-87: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait iletkenlik bulguları (µS/cm)

CLT (1:2)				
İletkenlik (µS/cm)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	20,2	18,98	19,53	19,69
2. Ay	19,47	19,41	19,58	19,62
3. Ay	21,8	22,8	23,2	23,9
6. Ay	20,9	20,4	20,4	21,0

Tablo 4-88: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait pH bulguları

CLT (1:2)				
pH				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	4,49	4,47	4,46	4,43
2. Ay	4,48	4,47	4,45	4,41
3. Ay	4,34	4,30	4,27	4,21
6. Ay	4,32	4,30	4,27	4,17

Tablo 4-89: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait damlacık boyutu bulguları (nm)

CLT (1:2)				
Damlacık Boyutu (nm)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	4,70±0,13	4,55±0,01	4,50±0,01	4,52±0,01
2. Ay	5,10±0,37	4,50±0,04	5,13±0,08	4,50±0,01
3. Ay	4,53±0,02	4,63±0,01	6,09±0,10	5,42±0,39
6. Ay	4,50±0,02	4,54±0,03	4,27±0,01	4,74±0,07

Tablo 4-90: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait polidispersite indeksi bulguları

CLT (1:2)				
Polidispersite İndeksi (PDI)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	0,125±0,010	0,092±0,026	0,096±0,010	0,086±0,007
2. Ay	0,178±0,038	0,090±0,009	0,204±0,008	0,100±0,004
3. Ay	0,102±0,012	0,114± 0,007	0,226±0,006	0,213±0,029
6. Ay	0,103±0,017	0,117±0,005	0,101±0,013	0,162 ±0,027

Tablo 4-91: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait zeta potansiyeli bulguları (mV)

CLT (1:2)				
Zeta Potansiyeli (mV)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	0,436±0,308	-0,438±0,395	-0,004±0,976	0,160±0,401
2. Ay	0,100±0,251	0,414±0,391	0,173±0,381	-0,306±0,049
3. Ay	-0,129±0,143	-0,060±0,147	0,039±0,441	-0,076±0,701
6. Ay	0,168±0,272	-0,122±0,576	0,281±0,746	-0,009±0,217

Tablo 4-92: CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyon formülasyonunun stabilite çalışmasına ait refraktif indeks bulguları

CLT (1:2)				
Refraktif İndeks (RI)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	1,406±0,00	1,406±0,00	1,406±0,00	1,406±0,00
2. Ay	1,406±0,00	1,406±0,00	1,406±0,00	1,406±0,00
3. Ay	1,406±0,00	1,406±0,00	1,406±0,00	1,406±0,00
6. Ay	1.404±0.00	1.404±0.00	1.405±0.00	1.405±0.00

4.18.2. Takrolimus Yüklü Mikroemülsiyon Formülasyonlarının Stabilitesinin Değerlendirilmesine Ait Bulgular

Takrolimus yüklü OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyonların stabiliteleri 2-8°C sıcaklık ile 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem (RH) koşullarında 3 ay süre ile izlendi. Formülasyonlara ait başlangıç verileri Tablo 4-93'te ve stabilite bulguları Tablo 4-94 ile Tablo 4-101 aralığında sunulmaktadır.

Tablo 4-93: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının geri kazanımlarına ve fiziksel özelliklerine ait başlangıç bulguları

İncelenen özellikler	Bulgular			
	OLT-CEL	OLT	OTT-PEG	OTT
Geri kazanım Takrolimus (%)	106,81±0,12	101,55±0,77	100,75±1,07	100,42±0,67
Viskozite (cP)	33,64 ±016	28,33±0,04	44,55±0,08	55,62±2,57
İletkenlik (µS/cm)	37,02±0,48	17,30±0,10	49,17±4,24	44,87±0,12
pH	4,41±0,02	4,42±0,07	4,92±0,10	5,21±0,06
Damlacık boyutu (nm)	6,82±0,09	4,18±0,28	7,92±0,02	4,07±0,59
PDI	0,219±0,006	0,180±0,037	0,248± 0,007	0,530±0,109
Zeta potansiyeli (mV)	0,130±0,564	0,033±0,110	-0,069±0,140	0,038±0,169
Refraktif indeks	1,405±0,00	1,415±0,00	1,410±0,00	1,418±0,00

Tablo 4-94: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının geri kazanımlarına ait stabilite bulguları

		Geri Kazanım (%)			
Stabilite Koşulları	Zaman Noktaları	OLT-CEL	OLT	OTT-PEG	OTT
2-8°C	1. Ay	106,39±1,08	104,58±0,45	98,95±1,52	97,04±3,70
	2. Ay	106,65±1,41	103,98±0,63	101,34±0,75	102,00±3,34
	3. Ay	103,75 ±1,94	103,08±1,22	103,02±3,30	100,02±0,96
25°C	1. Ay	105,21±2,30	104,57±0,19	97,77±1,01	98,55±2,02
%60 RH	2. Ay	106,33±0,18	103,03±0,38	101,31±1,25	99,57±1,69
	3. Ay	106,46±0,19	104,35±0,76	100,42±0,06	101,17±0,53

Tablo 4-95: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının viskozite ölçümlerine ait stabilite bulguları (cP)

Viskozite (cP)					
Stabilite Koşulları	**Zaman Noktaları**	**OLT-CEL**	**OLT**	**OTT-PEG**	**OTT**
2-8°C	1. Ay	42,11±2,16	28,01±0,12	55,67±2,52	56,47±0,03
	2. Ay	40,01±2,83	33,95±1,26	49,53±0,93	58,01±0,00
	3. Ay	36,81±0,18	32,93±0,63	51,82±1,74	53,43±0,30
25°C %60 RH	1. Ay	34,10±0,51	27,41±1,54	45,75±1,62	56,02±0,05
	2. Ay	33,11±0,48	28,45±0,15	52,01±1,71	53,24±0,03
	3. Ay	32,93±0,53	24,64±0,90	48,37±1,33	55,75±0,23

Tablo 4-96: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının iletkenlik ölçümlerine ait stabilite bulguları (µS/cm)

İletkenlik (µS/cm)					
Stabilite Koşulları	**Zaman Noktaları**	**OLT-CEL**	**OLT**	**OTT-PEG**	**OTT**
2-8°C	1. Ay	36,66±0,37	17,52±0,05	51,07±0,55	44,36±0,13
	2. Ay	36,80±0,17	18,40±0,09	53,36±0,24	44,45±0,21
	3. Ay	41,54±0,36	20,30±0,03	53,71±0,52	45,82±0,21
25°C %60 RH	1. Ay	40,90±1,33	19,42±0,11	52,08±0,20	45,75±0,03
	2. Ay	45,99±0,12	22,19±0,04	54,19±0,75	46,50±0,10
	3. Ay	53,13±0,17	27,99±0,10	56,94±0,24	48,00±0,14

Tablo 4-97: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının pH ölçümlerine ait stabilite bulguları

pH					
Stabilite Koşulları	**Zaman Noktaları**	**OLT-CEL**	**OLT**	**OTT-PEG**	**OTT**
2-8°C	1. Ay	4,37±0,03	4,42±0,05	4,96±0,07	5,28±0,04
	2. Ay	4,38±0,03	4,48±0,05	5,01±0,02	5,25±0,02
	3. Ay	4,39±0,03	4,46±0,07	5,00±0,04	5,26±0,04
25°C %60 RH	1. Ay	4,26±0,01	4,37±0,04	4,96±0,07	5,31±0,04
	2. Ay	4,24±0,04	4,31±0,03	5,05±0,02	5,32±0,05
	3. Ay	4,25±0,03	4,41±0,02	5,08±0,02	5,35±0,03

Tablo 4-98: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının damlacık boyutlarına ait stabilite bulguları (nm)

Damlacık Boyutu (nm)					
Stabilite Koşulları	**Zaman Noktaları**	**OLT-CEL**	**OLT**	**OTT-PEG**	**OTT**
2-8°C	1. Ay	6,81±0,03	4,99±0,08	8,70±0,02	4,51±0,12
	2. Ay	7,01±0,00	4,00±0,01	7,79±0,10	10,19±2,99
	3. Ay	6,93±0,05	4,06±0,03	8,18±0,08	8,66±3,36
25°C %60 RH	1. Ay	6,91±0,04	4,30±0,04	8,83±0,09	5,72±1,22
	2. Ay	6,85±0,01	4,11±0,04	8,66±0,05	8,07±1,65
	3. Ay	7,02±0,04	4,07±0,01	8,95±0,14	3,58±0,12

Tablo 4-99: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının polidispersite indekslerine ait stabilite bulguları

Polidispersite İndeksi (PDI)					
Stabilite Koşulları	**Zaman Noktaları**	**OLT-CEL**	**OLT**	**OTT-PEG**	**OTT**
2-8°C	1. Ay	0,212±0,006	0,247±0,010	0,250±0,010	0,537±0,040
	2. Ay	0,247±0,003	0,146±0,002	0,249±0,006	0,489±0,091
	3. Ay	0,220±0,005	0,176±0,005	0,240±0,011	0,280±0,019
25°C %60 RH	1. Ay	0,226±0,011	0,207±0,012	0,237±0,008	0,447±0,206
	2. Ay	0,213±0,009	0,179±0,014	0,245±0,010	0,257±0,028
	3. Ay	0,210±0,009	0,175±0,007	0,252±0,014	0,545±0,034

Tablo 4-100: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının zeta potansiyellerine ait stabilite bulguları (mV)

Zeta Potansiyeli (mV)					
Stabilite Koşulları	**Zaman Noktaları**	**OLT-CEL**	**OLT**	**OTT-PEG**	**OTT**
2-8°C	1. Ay	-0,020±0,390	0,150±0,540	0,420±0,500	-0,240±0,510
	2. Ay	-0,234±0,861	-0,099±0,072	0,467±0,053	-0,262±0,202
	3. Ay	-0,090±0,880	0,510±0,160	0,170±0,220	-0,090±0,350
25°C %60 RH	1. Ay	-0,206±0,641	0,066±0,535	0,146±0,654	-0,175±1,408
	2. Ay	-0,924±0,763	0,117±0,922	-0,263±0,602	-0,209±0,318
	3. Ay	0,100±0,280	-0,020±0,420	0,120±0,220	-0,170±0,590

Tablo 4-101: OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyon formülasyonlarının refraktif indeks ölçümlerine ait stabilite bulguları

Refraktif İndeks (RI)					
Stabilite Koşulları	**Zaman Noktaları**	**OLT-CEL**	**OLT**	**OTT-PEG**	**OTT**
2-8°C	1. Ay	1,405±0,00	1,415±0,00	1,409±0,00	1,418±0,00
	2. Ay	1,404±0,00	1,415±000	1,407±0,00	1,417±0,00
	3. Ay	1,405±0,00	1,415±0,00	1,409±0,00	1,418±0,00
25°C %60 RH	1. Ay	1,405±0,00	1,416±0,00	1,408±0,00	1,418±0,00
	2. Ay	1,405±0,00	1,415±0,00	1,408±0,00	1,417±0,00
	3. Ay	1,405±0,00	1,416±0,00	1,408±0,00	1,418±0,00

4.19. *In vivo* Koşullarda Etkin Madde Yüklenmemiş Mikroemülsiyonun Deri Üzerindeki Etkilerinin Biyofiziksel Yöntemlerle İncelenmesine Ait Bulgular

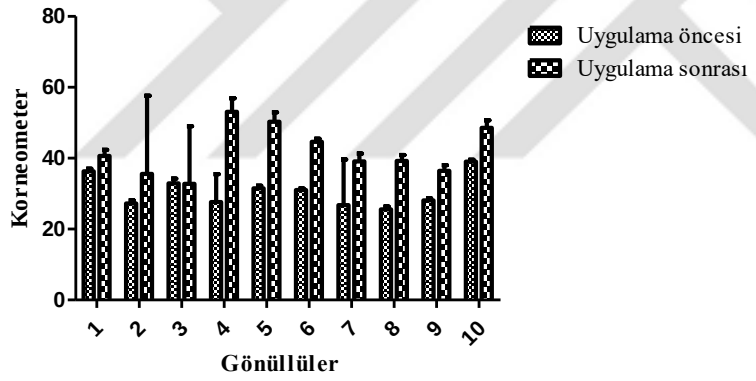
Yöntem 3.2.19.'da anlatıldığı şekilde çalışılarak, 10 sağlıklı gönüllünün ön kolunda uygulanma öncesi ve formülasyonların uygulanmasını takiben uygulama sonrası olmak üzere, deri hidratasyonu, transepidermal su kaybı ile deri pH ve renginin ölçümlerini kapsayan biyofiziksel ölçümler ile ATR-FTIR ölçümleri yapıldı. Çalışmaya ait bulgular Tablo 4-102, Tablo 4-103 ve Tablo 4-104'te verilmektedir. Sonuçlar ayrıca grafik halinde Şekil 4-32 ile Şekil 4-38 aralığında sunulmaktadır.

Tablo 4-102: Biyofiziksel ölçümlerin uygulama öncesi sonuçları (bazal değerler)

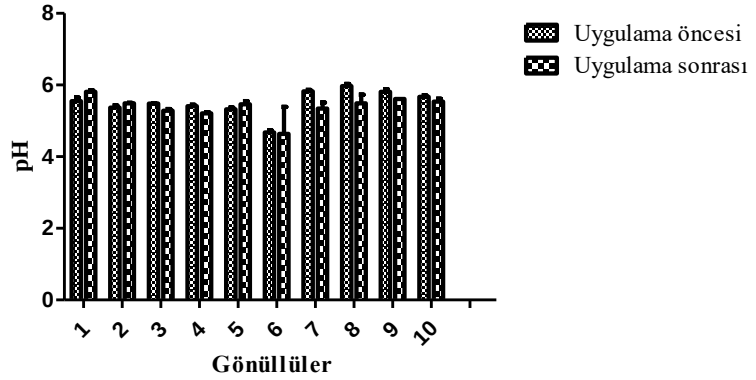
	Korneometer	**Mexameter**		**TEWL**	**pH**
		Eritem	**Melanin**	**(g.h/m^2)**	
Gönüllü 1	36,27 ± 0,79	152	223	5,6±0,13	5,55± 0,1
Gönüllü 2	27,23 ± 0,9	130	120	6,1±0,21	5,37 ±0,06
Gönüllü 3	32,92 ± 1,29	135	162	10,4±0,11	5,48 ±0,01
Gönüllü 4	27,63± 7,89	128	253	9,0±0,10	5,41± 0,04
Gönüllü 5	31,5 ± 0,75	162	257	6,30±0,19	5,32 ±0,05
Gönüllü 6	31,05 ±0,41	208,25	136,25	9,6±0,17	4,68 ±0,05
Gönüllü 7	26,77 ±12,84	198	97,67	9,3 ±0,08	5,82± 0,04
Gönüllü 8	25,55 ±0,8	199	103,75	10,9 ±0,07	5,97 ±0,06
Gönüllü 9	28,1 ±0,58	152	105	10,5 ±0,04	5,81± 0,07
Gönüllü 10	39,0± 0,54	112,75	71,5	9,4 ±0,07	5,67 ±0,04

Tablo 4-103: Biyofiziksel ölçümlerin uygulama sonrası sonuçları

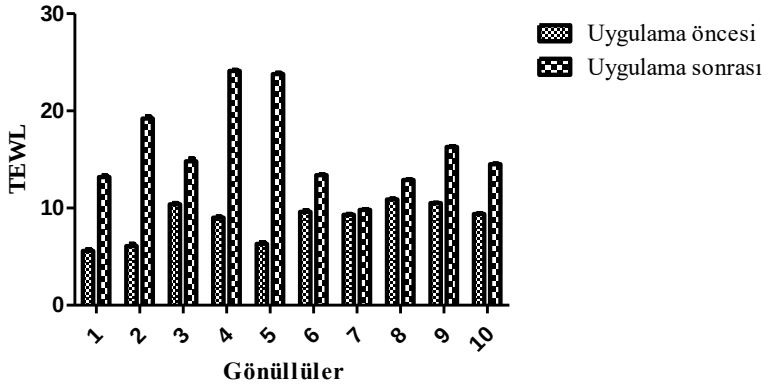
	Korneometer	Mexameter		TEWL	pH
		Eritem	Melanin	(g.h/m^2)	
Gönüllü 1	40,63 ± 1,74	156	216	13,2±0,14	5,81 ±0,04
Gönüllü 2	35,6 ± 22,01	130	120	19,2±0,22	5,49 ±0,01
Gönüllü 3	32,8 ± 16,22	137	208	14,8±0,28	5,28 ±0,05
Gönüllü 4	53,1 ± 3,82	110	223	24,1 ±0,12	5,21 ± 0,03
Gönüllü 5	50,3 ± 2,67	164	250	23,8 ±0,11	5,46 ± 0,09
Gönüllü 6	44,65 ±0,84	227	132,25	13,4 ±0,07	4,64 ±0,75
Gönüllü 7	39,13 ±2,2	195,5	118,5	9,8± 0,07	5,34 ±0,17
Gönüllü 8	39,2 ±1,73	215	112	12,9 ±0,06	5,49 ±0,24
Gönüllü 9	36,45 ±1,57	202,25	104,5	16,3 ±0,07	5,61 ±0,0
Gönüllü 10	48,57 ±2,16	134,5	86,5	14,5± 0,05	5,54 ±0,08



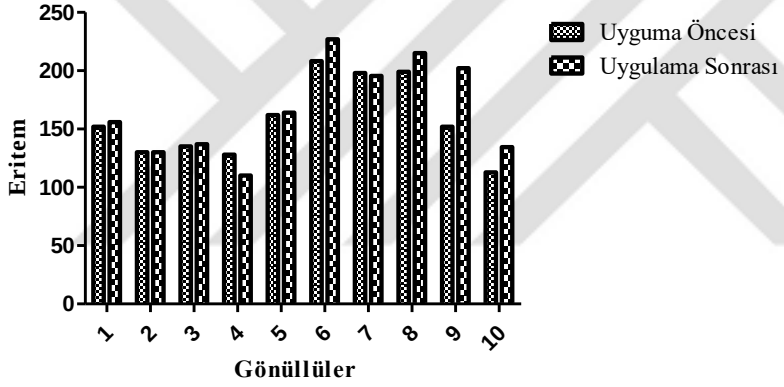
Şekil 4-32: Korneometre ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları



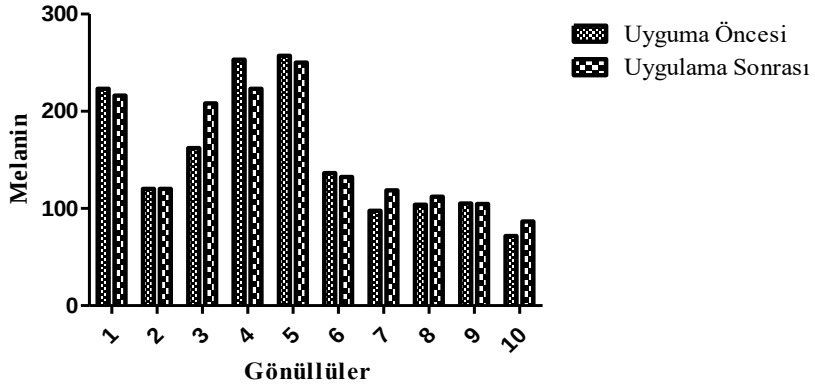
Şekil 4-33: pH ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları



Şekil 4-34: TEWL ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları (g.h/m^2)



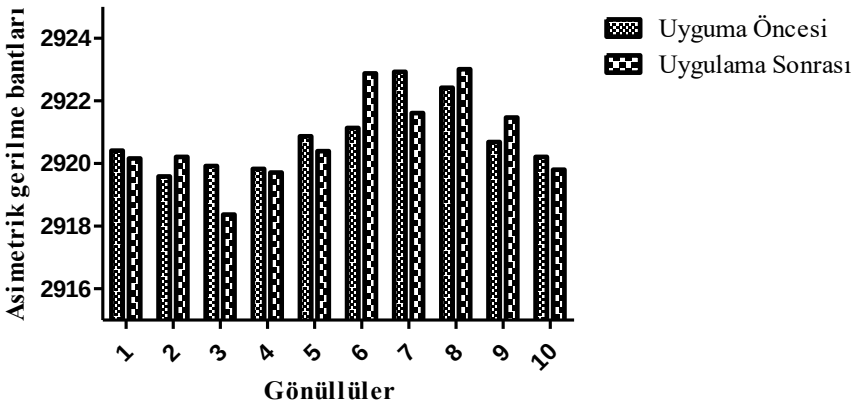
Şekil 4-35: Mexameter (Eritem) ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları



Şekil 4-36: Mexameter (Melanin) ölçümlerinin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları

Tablo 4-104: ATR-FTIR ölçümlerin uygulama öncesi ve sonrası sonuçları

		CH_2 asimetrik	CH_2 simetrik
Gönüllü 1	Uygulama Öncesi	2920,41	2851,95
	Uygulama Sonrası	2920,16	2872,72
Gönüllü 2	Uygulama Öncesi	2919,59	2850,63
	Uygulama Sonrası	2920,21	2870,70
Gönüllü 3	Uygulama Öncesi	2919,92	2851,31
	Uygulama Sonrası	2918,37	2873,11
Gönüllü 4	Uygulama Öncesi	2919,83	2850,92
	Uygulama Sonrası	2919,71	2869,22
Gönüllü 5	Uygulama Öncesi	2920,87	2852,32
	Uygulama Sonrası	2920,40	2873,29
Gönüllü 6	Uygulama Öncesi	2921,14	2851,52
	Uygulama Sonrası	2922,88	2854,43
Gönüllü 7	Uygulama Öncesi	2922,93	2851,52
	Uygulama Sonrası	2921,61	2857,69
Gönüllü 8	Uygulama Öncesi	2922,42	2850,63
	Uygulama Sonrası	2923,01	2856,86
Gönüllü 9	Uygulama Öncesi	2920,69	2854,14
	Uygulama Sonrası	2921,47	2852,45
Gönüllü 10	Uygulama Öncesi	2920,21	2850,63
	Uygulama Sonrası	2919,80	2851,42



Şekil 4-37: ATR-FTIR ölçümlerinde asimetrik gerilme bantlarının uygulama öncesi ve sonrası sonuçları



Şekil 4-38: ATR-FTIR ölçümlerinde simetrik gerilme bantlarının uygulama öncesi ve sonrası sonuçları

4.20. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Fiziksel Kontrollerine Ait Bulguları

Formülasyon optimizayonu tamamlanan merhem formülasyonlarının (MT-TC-9 ve MR-PC-6) görünüşleri incelendi, pH ve viskoziteleri ölçüldü.

4.20.1. Görünüş

Merhem formülasyonları görsel açıdan değerlendirildiğinde, her iki formülasyonunun da beyaz renkte, kokusuz ve sürülebilir/yayılabilir olduğu görüldü.

4.20.2. pH

Yöntem 3.2.20.2.'de anlatıldığı gibi merhem formülasyonlarının pH ölçümleri yapıldı. Bulgular Tablo 4-105'te gösterilmektedir.

4.20.3. Viskozite

Yöntem 3.2.20.3.'de anlatıldığı gibi merhem formülasyonlarının viskozite ölçümleri yapıldı. Bulgular Tablo 4-105'te gösterilmektedir.

Tablo 4-105: Optimizasyonu tamamlanan merhem formülasyonlarının pH ve viskozite ölçüm sonuçları

Fiziksel Kontroller	MT-TC-9	MR-PC-6
pH	5,74	6,20
Viskozite	28072,14	23057,58

4.21. Etkin Madde Yüklü Merhemlerin Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular

Optimizasyon çalışması tamamlanan merhemlerin yöntem 3.2.21.'de anlatıldığı gibi 2-8°C sıcaklık, 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem (RH), 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nem (RH), 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nem (RH), koşullarında 6 ay süre stabiliteleri izlendi. Her süre sonunda ön görülen kimyasal analizleri (etkin madde geri kazanımları ve safsızlık analizleri) ve fiziksel ölçümleri (pH ve viskozite) yapılarak başlangıç verileri ile karşılaştırıldı.

Merhem formülasyonlarının başlangıç zamanı ve stabilite noktalarına ait çalışma bulguları Tablo 4-106 ile Tablo 4-116 aralığında sunulmaktadır.

Tablo 4-106: Takrolimus ve Fusidik asit yüklenen merhem formülasyonlarının geri kazanım, toplam safsızlık ve fiziksel özelliklerine ait başlangıç bulguları

İncelenen özellikler	Başlangıç Bulguları	
	MT-TC-9	MR-PC-6
Geri kazanım-Fusidik asit (%)	100,3	101,5
Geri kazanım-Takrolimus (%)	98,3	99,8
Toplam Safsızlık (%)	1,1	1,4
Viskozite (cP)	28072,14	23057,58
pH	5,74	6,20

Tablo 4-107: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının takrolimus için geri kazanım bulguları (%)

MT-TC-9				
Takrolimus Geri Kazanım (%)				
Zaman Noktaları	2-8°C	25°C %60 RH	30°C %65 RH	40°C %75 RH
1. Ay	97,5	97,0	94,9	91,4
2. Ay	97,4	97,1	95,8	80,7
3. Ay	98,1	95,6	91,9	70,2
6. Ay	94,5	92,9	84,7	66,1

Tablo 4-108: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının fusidik asit için geri kazanım bulguları (%)

MT-TC-9				
	Fusidik asit Geri Kazanım (%)			
Zaman Noktaları	2-8°C	25°C %60 RH	30°C %65 RH	40°C %75 RH
1. Ay	98,5	98,0	99,0	97,0
2. Ay	100,0	101,5	99,0	90,0
3. Ay	98,5	100,0	101,0	87,5
6. Ay	97,5	98,0	96,0	90,0

Tablo 4-109: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait toplam safsızlık bulguları (%)

MT-TC-9				
	Toplam Safsızlık (%)			
Zaman Noktaları	2-8°C	25°C %60 RH	30°C %65 RH	40°C %75 RH
1. Ay	1,6	1,2	1,4	1,8
2. Ay	1,2	1,5	1,6	2,3
3. Ay	1,6	1,9	1,8	2,7
6. Ay	1,4	1,4	2,3	3,9

Tablo 4-110: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait viskozite bulguları (cP)

MT-TC-9				
	Viskozite (cP)			
Zaman Noktaları	2-8°C	25°C %60 RH	30°C %65 RH	40°C %75 RH
1. Ay	27434, 8	26703,7	34661,4	37237,9
2. Ay	33367,9	34511,4	37735,7	33180,4
3. Ay	28175,2	30106,1	27809,7	27031,7
6. Ay	28559,5	29618,7	36648,4	29565,9

Tablo 4-111: MT-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait pH bulguları

MT-TC-9				
	pH			
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	5,76	5,93	5,80	5,99
2. Ay	5,70	5,83	5,72	5,96
3. Ay	5,72	5,84	6,03	5,77
6. Ay	6,11	6,60	5,80	5,81

Tablo 4-112: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının takrolimus için geri kazanım bulguları (%)

MR-PC-6				
	Takrolimus Geri Kazanım (%)			
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	99,4	99,4	98,9	97,4
2. Ay	99,7	99,1	98,6	91,6
3. Ay	99,5	99,2	98,1	91,4
6. Ay	100,6	100,3	98,4	92,9

Tablo 4-113: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasının fusidik asit için geri kazanım bulguları (%)

MR-PC-6				
	Fusidik asit Geri Kazanım (%)			
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	102,5	102,0	103,0	102,5
2. Ay	103,0	103,0	102,5	103,5
3. Ay	103,0	103,0	102,5	103,5
6. Ay	102,8	102,5	102,0	106,5

Tablo 4-114: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait toplam safsızlık bulguları (%)

MR-PC-6				
Toplam Safsızlık (%)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	1,3	1,5	1,2	1,3
2. Ay	1,6	1,5	1,6	1,8
3. Ay	1,4	1,5	1,3	1,9
6. Ay	0,60	0,60	0,56	2,8

Tablo 4-115: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun çalışmasına ait viskozite bulguları (cP)

MR-PC-6				
Viskozite (cP)				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	26225,7	22082,8	26160,0	19973,9
2. Ay	21679,7	23179,4	24051,1	18736,6
3. Ay	23854,3	20948,7	18942,8	18417,9
6. Ay	23638,7	20920,5	18221,1	17096,4

Tablo 4-116: MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun stabilite çalışmasına ait pH bulguları

MR-PC-6				
pH				
Zaman Noktaları	**2-8°C**	**25°C %60 RH**	**30°C %65 RH**	**40°C %75 RH**
1. Ay	6,17	6,27	6,10	6,17
2. Ay	6,27	6,20	6,28	6,29
3. Ay	6,26	6,32	6,39	6,42
6. Ay	6,46	6,38	6,48	6,10

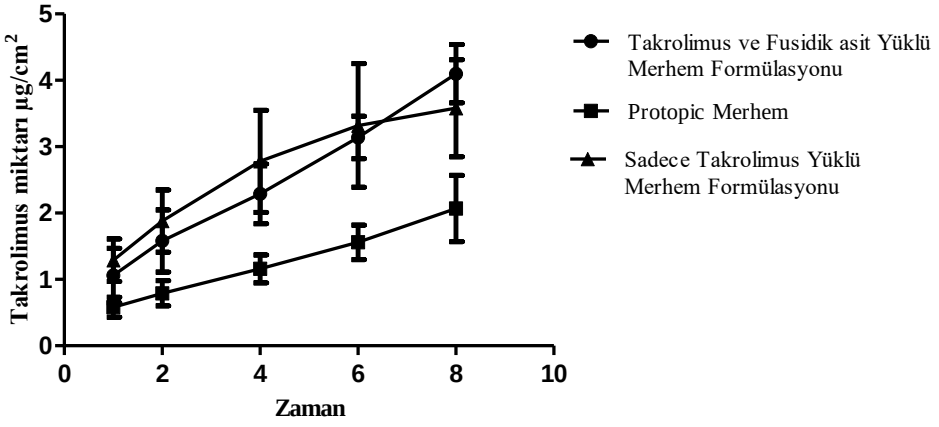
Elde edilen çıktılar göre; formülasyondaki etkin maddelerin geri kazanımlarının daha yüksek ve toplam safsızlıklarının daha düşük olduğu Takrolimus ve Fusidik asit yüklü çözücüsü Propilen karbonat olan merhem formülasyonu (MR-PC-6) ile *in vitro* salım ve *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarının yürütülmesine karar verildi.

4.22. Merhem Formülasyonundan Etkin Maddelerin Sentetik Membrandan *In Vitro* Salım Çalışmalarına Ait Bulgular

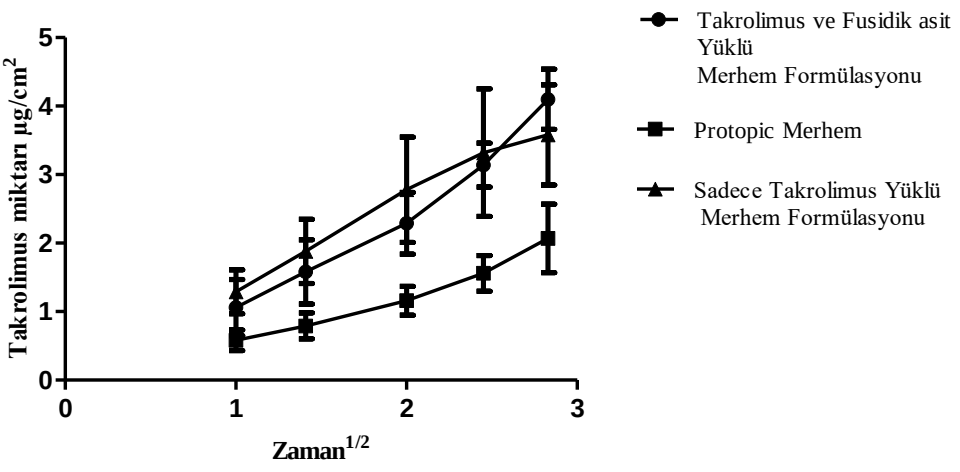
Yöntem 3.2.22.'de anlatıldığı gibi *in vitro* salım çalışmaları yapıldı. Çalışma bulguları Tablo 4-117 ile Tablo 4-118'de ve Şekil 4-39 ile Şekil 4-42 aralığında sunulmaktadır.

Tablo 4-117: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Protopic® merhem ve sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonlarından takrolimusun *in vitro* salım bulguları

	Takrolimus ve Fusidik asit yüklü Merhem Formülasyonu		Protopic® Merhem		Sadece Takrolimus yüklü Merhem Formülasyonu	
Saat	Ortalama	SD (±)	Ortalama	SD (±)	Ortalama	SD (±)
1	1,06	0,41	0,58	0,15	1,29	0,32
2	1,58	0,47	0,79	0,19	1,88	0,47
4	2,29	0,45	1,16	0,21	2,78	0,77
6	3,14	0,32	1,56	0,26	3,32	0,93
8	4,10	0,44	2,07	0,50	3,58	0,73



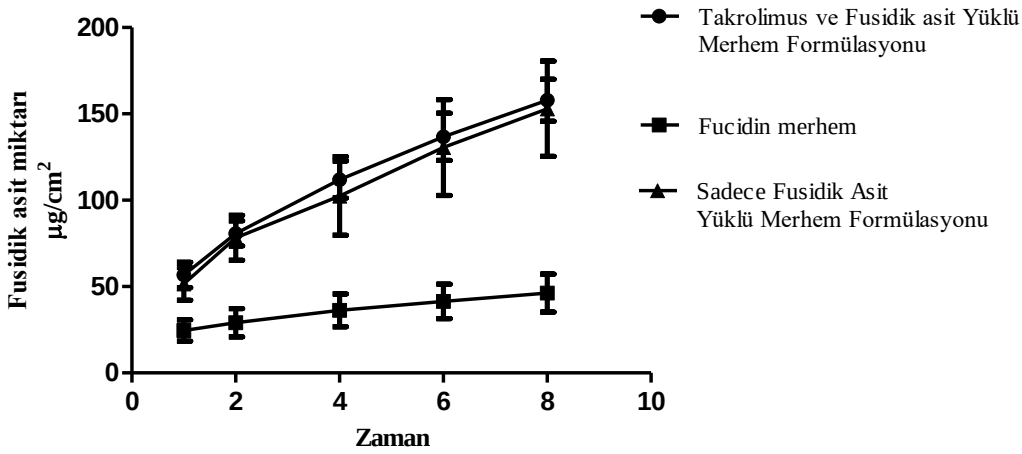
Şekil 4-39: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Protopic® merhem ve sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonlarından takrolimusun Fick'in Birinci Yasası'na göre *in vitro* salım profilleri



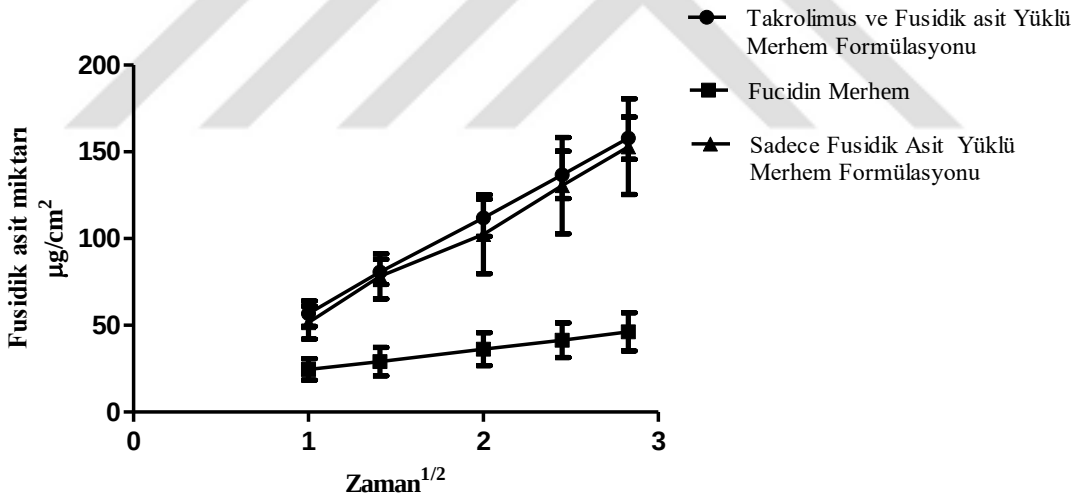
Şekil 4-40: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Protopic® merhem ve sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonlarından takrolimusun Higuchi Kinetik modeline göre *in vitro* salım profilleri

Tablo 4-118: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Fucidin® merhem ve sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarından fusidik asidin *in vitro* salım çalışmaları bulguları

	Takrolimus ve Fusidik asit yüklü Merhem Formülasyonu		**Fucidin® Merhem**		**Sadece Fusidik asit yüklü Merhem Formülasyonu**	
Saat	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD
1	56,70	7,36	24,53	6,17	51,55	9,55
2	80,83	7,18	29,09	8,18	78,24	12,97
4	111,97	10,72	36,29	9,48	102,45	22,77
6	136,80	13,67	41,45	9,96	130,54	27,74
8	157,85	12,17	46,23	11,00	152,97	27,60



Şekil 4-41: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Fucidin® merhem ve sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarından fusidik asidin Fick'in Birinci Yasası'na göre *in vitro* salım profilleri



Şekil 4-42: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Fucidin® merhem ve sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarından fusidik asidin Higuchi Kinetik modeline göre *in vitro* salım profilleri

4.23. Merhem Formülasyondan Etkin Maddelerin Domuz Derisinden *In Vitro* Penetrasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

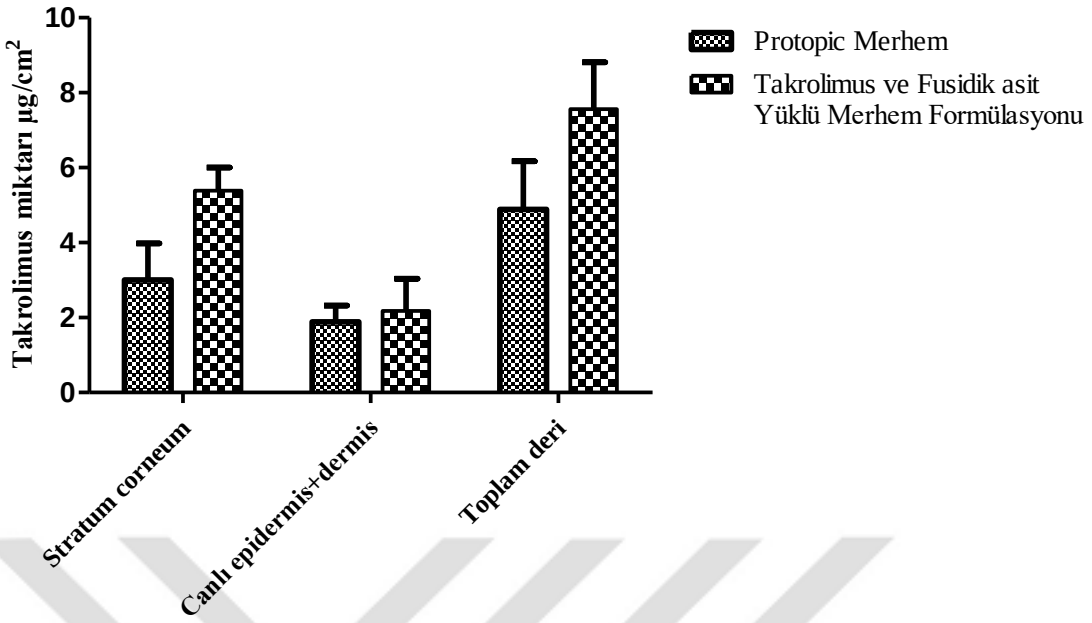
Dermal tabakalardaki etkin maddelerin miktar tayini, yöntem 3.2.23.'de anlatılan şekilde yapıldı. Penetrasyon çalışmalarına ait bulgular Tablo 4-119 ile Tablo 4-120'de ve Şekil 4-43 ile Şekil 4-44'de sunulmaktadır.

Tablo 4-119: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatları ile yapılan 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asit miktarları

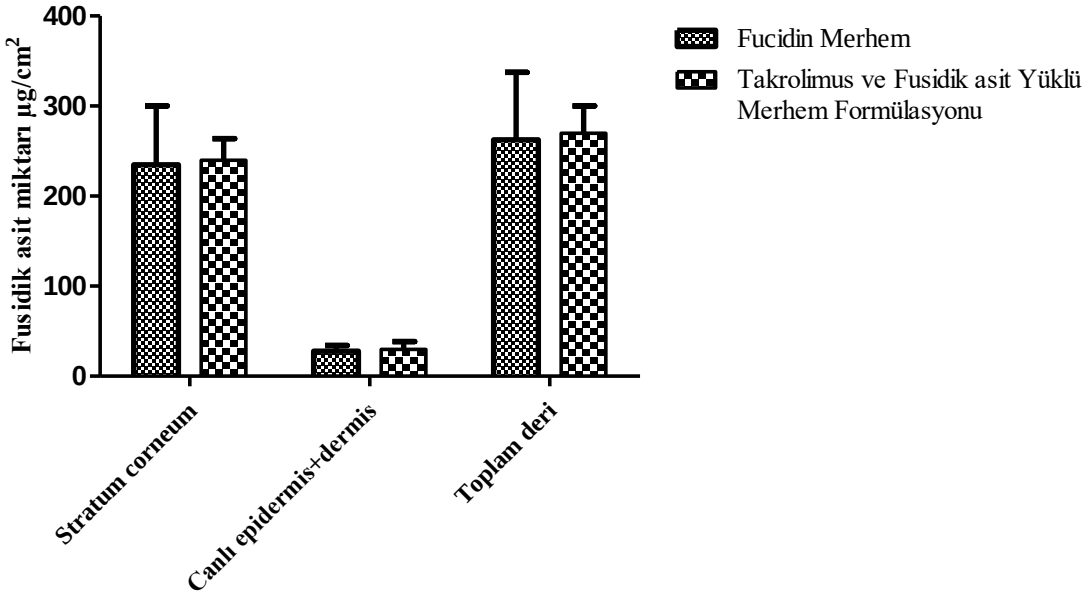
Formülasyon kodu	Takrolimus (µg/cm²)		Fusidik asit (µg/cm²)	
	Stratum corneum	Canlı *epidermis dermis*	*Stratum corneum*	Canlı *epidermis dermis*
Takrolimus ve Fusidik asit yüklü Merhem formülasyonu (MR-PC-6)	5,39±0,61	2,18±0,86	239,82±23,91	29,90±8,59
Protopic® merhem	3,00±0,98	1,89±0,43	-	-
Fucidin® merhem	-	-	234,73±65,58	27,68±6,62

Tablo 4-120: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatları ile yapılan 12 saat *in vitro* penetrasyon çalışmalarını takiben derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asitin toplam miktarları

Formülasyon kodu	Takrolimus (µg/cm²)	Fusidik asit (µg/cm²)
	Toplam Deri	Toplam Deri
Takrolimus ve Fusidik asit yüklü Merhem formülasyonu (MR-PC-6)	7,56±1,25	269,72±30,59
Protopic® merhem	4,89±1,28	-
Fucidin® merhem	-	262,41±74,98



Şekil 4-43: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatının (Protopic® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben takrolimusun deri tabakalarındaki birikim miktarları



Şekil 4-44: Takrolimus ve Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu (MR-PC-6) ve piyasa preparatının (Fucidin® merhem) *in vitro* domuz derisinden 12 saat penetrasyonunu takiben fusidik asidin deri tabakalarındaki birikim miktarları

4.24. Etkin Madde Yüklü Merhem Formülasyonunun ATR-FTIR (Azaltılmış Toplam Yansımalı Fourier Dönüşümlü Kızılötesi) Spektrometresi ile Deri Üzerindeki Etkilerinin *In vitro* Koşullarda İncelenmesi Çalışmalarına Ait Bulgular

Merhem formülasyonunun bileşenlerinin deri üzerindeki etkileri ATR-FTIR spekroskopisi ile yöntem 3.2.24.'te anlatıltıldığı şekilde çalışılarak yapıldı. Elde edilen bulgular Tablo 4-121'de gösterilmektedir.

Tablo 4-121: ATR-FTIR sonuçlarına göre bant değişimleri

Formülasyon Kodu	CH_2 asimetrik gerilme bandı (cm^{-1})	CH_2 simetrik gerilme bandı (cm^{-1})
Takrolimus ve Fusidik asit yüklü Merhem formülasyonu (MR-PC-6)	2917,63 ±0,25	2849,60±0,16
Protopic® merhem	2918,64±0,23	2850,10 ±0,22
Fucidin® merhem	2918,88±0,63	2850,28± 0,72
Kontrol derisi	2919,31 ±0,18	2851,54 ±0,21

5. TARTIŞMA

Atopik dermatit (AD) derinin bariyer özelliğini destekleyen proteinlerin genetik bozukluğunu içeren kaşıntılı, kronik, enflamatuvar bir dermatolojik hastalıktır (Plötz ve Ring 2010). AD, immünolojik değişimlerin eşlik ettiği, genetik ve çevresel faktörlerin birbiri ile etkileşimi sonucu gelişen karmaşık bir hastalık olarak tanımlanır (Bieber 2007). Hastalığın patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte, ortaya çıkmasında immunoglobulin *(I*g*) E* ile oluşan tip I reaksiyonların ve *T* hücreleri ile oluşan tip IV reaksiyonların etkili olduğu belirtilmektedir (Lugovic ve ark. 2001).

AD hastalığında, derinin *stratum corneum* tabakasında bulunan seramitlerde yetersizlik ve bariyer özelliğinde bozulma görülür (Simpson ve ark. 2013). Spesifik olarak, hastalık kuru bir deri ve derinin düşük su tutma kapasitesi ile tanımlanır (Jensen-Michael J. ve ark 2006 p. 571).

Prevelansı ikinci dünya savaşından beri artmakta olan AD hastalığında, deride aşırı *Staphylococcus aureus* kolonizasyonu görülmektedir (Leung 2000). Bu durum, alerjik duyarlaşmaya ve enflamasyona neden olarak AD hastalarında ikincil bakteri enfeksiyonlarının gelişimine yol açmaktadır (Walling ve Swick 2010).

AD tedavisinin temelini, alerjenler ve kimyasallar gibi hastalığı tetikleyici faktörlerden kaçınılması ve derinin nemlendirilmesi ile sağlanan deri hidrasyonu oluşturur. Deride enflamasyon varlığında ise, topikal ilaç tedavisi (topikal kortikosteroitler ve topikal kalsinörin inhibitörleri) uygulanır (Akdiş ve ark. 2006).

Topikal kortikosteroitler hastalığın akut alevlenmelerinin tedavisinde yarar/risk oranı dikkate alınarak kısa süreli yer almaktadır (Akdiş ve ark. 2006). Kalsinörin inhibitörleri ise (pimekrolimus ve takrolimus) AD'nin ikinci basamak tedavisinde topikal kortikosteroit tedavisine yanıt vermeyen veya topikal kortikosteroitlerin uygun olmadığı hastalarda kullanılmaktadır (Simpson 2010).

Dermatolojik hastalıkların tedavisinde topikal uygulama, derideki patolojik bölgelerin hedef alındığı ve en az düzeyde sistemik absorpsiyonun sağlandığı bir tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir (Williams 2003 p.193; Brown ve ark. 2006; Colin Long 2007 p.41). AD hastalığının topikal tedavisi; kaşıntı ve enflamasyonun baskılanmasının yanında, hastalıkta ikincil olarak gelişen deri enfeksiyonlarının giderilmesini de kapsar (Akdiş ve ark. 2006).

Takrolimus, *Streptomyces tsukubaensis* isimli bir bir toprak bakterisinden fermente edilen makrolit lakton yapısında immünosüpresan etkili bir ilaçtır (Ruzicka ve ark. 1999; Gupta ve ark. 2002). Sistemik ve topikal olarak enflamasyonlu deri hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Ruzicka ve ark. 1999). Takrolimus; AD, kontakt dermatit ve *psöriasis*'te topikal olarak, inatçı *psöriasis* ve Behçet hastalığında oral yol ile uygulanmaktadır (Assmann ve ark. 2000; Gupta ve ve ark. 2002).

Takrolimus kalsinörin inhibisyonuna yol açarak enflamatuvar sitokinlerin salımını engeller (Gutfreund ve ark. 2013). Takrolimusun *T* lenfositleri ve mast hücreleri, eozinofilleri, bazofilleri ve en önemlisi *Langerhans* hücrelerini etkilediği; endotel hücrelere ve fibroblastlara etki etmediği bildirilmiştir (Nghiem ve ark. 2002). Bu nedenle, topikal steroit tedavisinde oluşan deri atrofisi, kalsinörinin kolajen sentezinde rol oynamamasından dolayı takrolimus ile meydana gelmez (Bekersky ve ark. 2001). Takrolimus'un ülkemizde ve dünyada orijinal ürün olarak %0,03 ve %0,1 takrolimus içeren Protopic® isimli merhem şeklinde topikal preparatları mevcuttur (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017).

Takrolimus; 822,03 g/mol moleküler ağırlığında (USP 36, 2013), sudaki çözünürlüğü zayıf (4 µg/mL) (Li ve ark. 2012) ve lipofilik karakterde (log P 3,19-5,59) bir etkin maddedir (Tacrolimus – DrugBank, Erişim tarihi: 23.01.2017). Aşırı lipofilik karakterde bir etkin maddenin topikal uygulamasının ardından *stratum corneum* tabakasına partisyonunun yüksek olması beklenir (Jadoul ve ark. 1995). Ancak, söz konusu etkin madde takrolimus gibi sudaki çözünürlüğü düşük ve yüksek molekül ağırlıklı bir madde olduğunda (Silva-Cunha ve ark. 2014), *stratum corneum*dan canlı *epidermis* ve *dermis* tabakalarına difüzyon hızı azalır (Jadoul ve ark. 1995). Dolayısıyla, topikal uygulanan takrolimusun derideki hedef bölgelere (*epidermis*te bulunan *Langerhans* hücrelerine ve *epidermis* ve *dermis*te bulunan *T* hücrelerine) ulaşması fizikokimyasal özelliklerinden dolayı zorlaşmaktadır (Lapteva ve ark. 2014).

Bu durumda, takrolimusun topikal AD tedavisinin etkinliğini artıracak, konvansiyonel dozaj şekli olan merhem preparatına alternatif yenilikçi topikal formülasyonlarının geliştirilmesi önem taşımaktadır. Bu yaklaşıma yönelik olarak son yıllarda araştırmalar yapılmıştır (Pople ve Singh 2010; Goebel ve ark. 2011; Pople ve Singh 2011; Li ve ark. 2012; Lei ve ark. 2013; Lapteva ve ark. 2014).

Yenilikçi nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde, etkin maddenin etkinliğinin artırılması kadar toksik etkilerinin azaltılabilmesi de önemlidir (Şenyiğit ve ark. 2012). Şenyiğit ve ark. güçlü bir kortikosteroit olan klobetasol-17-propionat yüklü lesitin-kitozan yapılı nanopartikülleri, piyasa preparatına göre 10 kat doz azaltılması yaparak hazırlamışlardır. Geliştirdikleri formülasyonda ilacın etkinliğinin artırıldığını ve doza bağlı yan etkilerin azaltıldığını domuz kulağı derisi kullanarak *in vitro* permeasyon çalışmalarıyla göstermişlerdir (Şenyiğit ve ark. 2010). Geliştirilen nanopartiküllerin antienflamatuvar etkileri ve tolerabiliteleri ise Wistar sıçanlarda *in vivo* çalışmalar yapılarak değerlendirilmiştir (Şenyiğit ve ark. 2016).

Fusidik asit, *Fusidium coccineum*'un fermentasyon ürünlerinden izole edilen fusidan yapılı bir antibiyotiktir. Etki mekanizması, bakteride protein sentezini ribozomlara bağlanmadan baskılanmasına dayanır (Rigopoulos ve Larios 2008). Fusidik asidin topikal preparatları (krem ve merhem), AD ve kontakt dermatit gibi deri hastalıkları sonucu ortaya çıkan enfeksiyonlarda (ikincil enfeksiyonlar) yaygın olarak kullanılmaktadır (Long 2008).

Fusidik asit; molekül ağırlığı 525,7 g/mol olan, suda çözünürlüğü çok düşük (EP 8.0, 2012), lipofilik özellikte (log P 4,42-4,97) (Fusidic Acid – DrugBank, Erişim tarihi: 23.11.2016) bir etkin maddedir.

Epidermal lipitlerin meydana getirdiği penetrasyon bariyerinin dermal absorpsiyonu etkilemesinden dolayı hem yenilikçi taşıyıcıların hem de kombine yaklaşımların topikal biyoyararlanımı artırabilmesi ve sistemik yan etkilerin azaltılması açısından avantajlı olabileceği ifade edilmiştir (Şenyiğit ve ark. 2012). AD tedavisinde de, topikal uygulanan etkin maddelerin birlikte kullanımı bir tedavi seçeneği oluşturmaktadır. Günümüzde, fusidik asidin topikal kortikosteroitlerle kombine preparatları mevcuttur (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017). AD tedavisinde takrolimus ve fusidik asiti bir arada içeren kombine bir preparat mevcut değildir (RX Media Pharma Erişim tarihi:29.01.2017) ve geliştirildiği takdirde tedavi açısından yeni bir seçenek oluşturma potansiyeli mevcuttur.

Mikroemülsiyonlar; yağ, su, sürfaktan ve kosürfaktan moleküllerinden oluşan yüzeyler arası bir film ile stabilize edilmiş, termodinamik açıdan kararlı, saydam, izotropik ve düşük viskoziteli koloidal dispersiyonlardır (Djekic ve ark. 2012; Fanun 2012; Kalaitzaki ve ark. 2014). Mikroemülsiyonların önemli avantajları arasında yer alan

kendiliğinden oluşma özellikleri ve hazırlanmalarında bir enerji kaynağı gerektirmemeleri (Heuschkel ve ark. 2008), endüstriyel üretimlerinde ölçek büyütülmesi açısından da kolaylık sağlamaktadır (Patravale ve Date 2009 p.261). Ayrıca, mikroemülsiyonlar, lipofilik maddelerin *stratum corneum* ve daha derin deri tabakalarına ulaşmasını sağlayan, nano boyutta damlacık büyüklüğüne sahip ve yenilikçi özellikte potansiyel topikal ilaç taşıyıcıları arasında yer alırlar (Neubert 2011).

Mikroemülsiyonların ilaç moleküllerinin deriden geçişini iyileştirmesine yönelik potansiyel etki mekanizmaları öne sürülmüştür. İlk olarak, mikroemülsiyonların hem hidrofilik hem de lipofilik yapıdaki maddeler için yüksek çözündürme kapasitesine sahip olduğu belirtilir (Hathout ve Nasr 2013). Bu özellik, mikroeemülsiyonların geniş yüzey alanı ve aynı tek fazlı sistemde farklı polariteye sahip çeşitli mikro alanlara sahip olmasıyla açıklanır (Sahle ve ark. 2013). Böylece, etkin maddenin doygun veya aşırı doygun bulunmasını sağlayarak termodinamik aktivitesini artırdığı ve taşıyıcı sistemden uygulama alanı deriye doğru büyük bir konsantrasyon gradienti oluşturdukları belirtilmektedir (Peltola ve ark. 2003; Teichmann ve ark. 2007; Heuschkel ve ark. 2008). İkinci olarak, mikroemülsiyon bileşenlerinin güçlü penetrasyon artırıcı etkiye sahip olması (Hathout ve Elshafeey 2012) ve bu bileşenlerin *stratum corneum*'daki lipit düzeni etkilemesi (Baroli ve ark. 2000) ile ilaç moleküllerinin *stratum corneum*'dan derinin daha derin tabakalarına difüzyon hızını artırması öngörülmektedir. Üçüncü olarak, mikroemülsiyonların sahip oldukları düşük yüzey gerilimleri nedeniyle ilaç moleküllerinin deriye yüksek oranda temasının iyi bir yayılabilirlik sağladığı ortaya atılmıştır (Heuschkel ve ark. 2008). Dördüncü olarak ise, ara yüzeyde sürekli ve kendiliğinden oluşan dalgalanma, ilaç moleküllerinin hareketliliğini ve difüzyonun hızını artırmaktadır (Kitagawa ve ark. 2009).

Merhemler, topikal tedavide yaygın olarak kullanılan yarı katı topikal formülasyonlardır. Sahip oldukları oklüzif (örtücü) özellikleri sayesinde ekzema, *psöriasis* ve dermatit gibi kronik dermatolojik bozukluklarda sıklıkla tercih edilirler. Merhemlerin sağladığı örtücü etki, özellikle emoliyentler olarak son derece yararlı olmakla birlikte, hidrokarbon bazlı merhemler derideki hidrasyonu artırarak, etkin maddenin permeasyonunu artırabilir (Williams 2003, p.173).

Topikal uygulanan preparatların formülasyon optimizasyonundaki temel yaklaşımı; hastalığa bağlı derinin hedef tabakalarında beklenen etkin madde

konsantrasyonlarının sağlanması ile etkin bir tedavi gerçekleştirilirken, sistemik dolaşıma en az düzeyde katılım sağlanmasıdır (Shah ve Williams 2014 p. 61). Bu nedenle, topikal uygulanan ürünlerin geliştirilmesi için formülasyonlardan serbestleşen etkin maddenin derinin tabakalarındaki dağılımının ve lokalizasyonunun değerlendirilmesi oldukça önem taşımaktadır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı; tek takrolimus ve takrolimus ile fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren, topikal uygulamaya yönelik yenilikçi mikroemülsiyon sistemlerinin geliştirilmesi, geliştirilen mikroemülsiyonların fizikokimyasal özelliklerinin araştırılması, optimize edilen formülasyonların fiziksel ve kimyasal stabilitelerinin izlenmesi, *in vitro* penetrasyon çalışmalarının ardından bantla soyma yöntemi kullanılarak (*tape stripping*) etkin maddelerin derinin farklı tabakalarında dağılımlarının kantitatif olarak değerlendirilmesi, mikroemülsiyonların deri üzerinde oluşturdukları etkilerin ATR-FTIR spektrometresi ile incelenmesi, CLSM görüntüleme tekniği ile takrolimus gibi lipofilik karakterde bir model flüoresan maddenin (Nil Kırmızısı) optimize edilen mikroemülsiyonlar ile deri üzerine uygulandığında, deriden penetrasyon derinliği, derinin tabakalarındaki dağılımı ve lokalizasyonu hakkında bilgi sağlanması, ayrıca *in vitro* çalışmalar doğrultusunda seçilen mikroemülsiyonun deri üzerindeki etkilerinin biyofiziksel yöntemler ile *in vivo* sağlıklı gönüllüler üzerinde incelenmesini kapsamaktadır.

Aynı zamanda takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren ve oklüzif özelliği yüksek olan merhem formülasyonlarının da geliştirilmesi, bu formülasyonların fizikokimyasal özellikleri ile stabilitelerinin değerlendirilmesi, sentetik membranlar kullanılarak optimize edilen merhem formülasyonlarından etkin maddelerin salım karakteristiğinin incelenmesi, *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarıyla etkin maddelerin deriden penetrasyon derinliği ve birikiminin saptanması, ATR-FTIR analizleri ile formülasyon bileşenlerinin deri üzerindeki etkileri hakkında bilgi sağlanması da amaçlanmıştır.

Sonuç olarak bu tez kapsamında yürütülen çalışmalar ile AD tedavisine yönelik; takrolimus ile fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren ve özellikle takrolimusun, derinin hedef tabakalarındaki lokalizasyonunu ve dağılımını iyileştiren, pazarda mevcut preparatlara alternatif teşkil edecek, yenilikçi topikal ürünlerin geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Formülasyonların optimizasyonu için öncelikle ön formülasyon çalışmaları yürütüldü. Bu kapsamda; takrolimus ve fusidik asit ile her iki etkin maddenin fiziksel toz karışımının IR spektrumları alındı. Şekil 4-1'de sunulan IR spektrumlarıyla elde edilen piklerin DMF verileri ile uyumlu olduğu görüldü (Fusidik asit İlaç Ana Dosyası, 2011; Takrolimus İlaç Ana Dosyası, 2014). Ayıca, diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) analizleri gerçekleştirildi. Takrolimus ve fusidik asit ayrı ayrı olarak ve her ikisinin fiziksel karışımı analiz edilerek DSC termogramları elde edildi. Bulgulara göre, takrolimus ve fusidik asit için erime noktaları sırası ile 119,7-138,5ºC ve 136,28 – 149,89 ºC (Şekil 4-2) olarak saptandı. Her iki etkin maddenin karışımının termogramı incelenerek (Şekil 4-3) etkin maddelerin birbiriyle etkileşmediği belirlendi.

Ön formülasyon çalışmaları doğrultusunda, etkin maddelerin mikroemülsiyon ve merhem formülasyonlarında kullanılması planlanan yardımcı maddelerdeki (Tablo 3-1) çözünürlükleri kantitatif olarak hesaplandı (Tablo 4-1 ile Tablo 4-2 ve Şekil 4-4 ile Şekil 4-5). Bulgulara göre, hem takrolimus hem de fusidik asidin yardımcı maddelerdeki çözünürlüklerinin sıralama açısından benzer olduğu saptandı. Her iki etkin maddenin de yağ fazı maddelerindeki çözünürlüğü; sırası ile Capryol 90> Lauroglycol FCC> Oleik asit> Labrafac PG olarak bulundu. Kosürfaktanlardaki çözünürlükleri ise, sırası ile Transcutol P> PEG-400 >Propilen glikol olarak bulundu. Her iki etkin maddenin sürfaktanlardaki çözünürlüğü de sırası ile Labrasol >Tween 20 >Tween 80 şeklindedir. Takrolimusun diğer iki sürfaktandaki çözünürlüğü ise Kolliphor EL> Kolliphor RH 40 sırası ile elde edilirken, fusidik asitin çözünürlüğü Kolliphor RH 40'de Kolliphor EL'e göre daha yüksek bulundu.

In vitro salım çalışmalarında kullanılacak çözünme ortamının sonsuz seyrelme (*sink*) koşulunu sağlayacak şekilde seçilmesi için her iki etkin maddenin farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlüğü saptandı (Tablo 4-3). Elde edilen bulgulara göre, reseptör faz olarak sink koşulu sağlayan izotonik hale getirilmiş fosfat tamponu (PBS; pH 7,4):Etanol karışımı (70:30; h:h) belirlendi.

Takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin yardımcı maddelerle (Tablo 3-2) aralarındaki etkileşimin araştırılması için, safsızlık çalışmaları 40±2˚C sıcaklık ve %75±5 bağıl nem koşulunda 15 gün ve/veya 30 gün; iki etkin maddenin kendi aralarındaki etkileşimin araştırılması için, aynı sıcaklık ve bağıl nem koşulunda 30 gün ve 60°C sıcaklıkta etüvde 7 gün izlendi. Bulgular Tablo 4-4, Tablo 4-5 ve Tablo 4-6'da

gösterilmiştir. Etkin madde yardımcı madde karışımlarının toplam safsızlık bulguları başlangıç verileriyle kıyaslandığında artış olduğu görüldü. Bu durumun zorlayıcı koşullardan kaynaklandığı düşünüldü. Dolayısı ile söz konusu yardımcı maddelerin mikroemülsiyon ve merhem formülasyonlarında kullanılabileceklerine karar verildi. Etkin maddeler ayrı olarak toz halde ve bir aradaki toz karışımları değerlendirildiğinde; takrolimusun safsızlıklarında artış olmadığı, dolayısı ile takrolimusun sıcaklığa bağlı olarak etkilenmediği, fusidik asitin ise safsızlıklarında saptanan artışın DMF verileriyle benzerlik gösterdiği bulundu (Fusidik asit İlaç Ana Dosyası, 2011; Takrolimus İlaç Ana Dosyası, 2014).

Mikroemülsiyon formülasyon optimizasyon çalışmalarında Tablo 3-3'de yer alan yardımcı maddeler kullanıldı. Mikroemülsiyonlar literatürde kayıtlı "titrasyon yöntemi" kullanılarak hazırlandı (Butani ve ark. 2014). Mikroemülsiyonların bileşenlerinin seçiminde; etkin maddelerin çözünürlük ve safsızlık çalışmaları ile sürfaktan:kosürfaktan ve yağ fazı bileşenlerinin deriyle etkileşimi dikkate alındı. Hazırlanan mikroemülsiyonlar, su tutma kapasiteleri, türbidite, jelleşme durumu, damlacık boyutları ve polidispersite indeksleri (PDI), fiziksel karalılıkları açısından değerlendirildi.

Formülasyonlar geliştirilirken öncelikle AD hastalığında derinin ileri derecede kuru olma durumu (Hanifin ve Tofte 1999) dikkate alınarak, mikroemülsiyonların su tutma kapasitesinin yüksek olmasına önem verildi. Bu amaçla yağ:sürfaktan-kosürfaktan oranları 1:9, 2:8, 3:7 olarak belirlendi ve su içinde yağ mikroemülsiyonları hazırlandı (Tablo 3-4, Tablo 3-5 ve Tablo 3-6). Hazırlanan formülasyonların görsel olarak incelenmesinin ardından, faz ayırımı olmayan, berraklığını koruyan ve toplam %25-%50 aralığında su içeren mikroemülsiyonların damlacık boyutu ve polidispersite indeksleri ölçüldü (Tablo 4-7, Tablo 4-8 ve Tablo 4-9).

Mikroemülsiyonlar hazırlanırken formülasyon bileşenlerinin seçiminde; etkin maddenin farklı yağlar, sürfaktanlar ve kosürfaktanlardaki çözünürlüğü de dikkate alınır (Butani ve ark. 2014; Ge ve ark. 2014). Bu durum, çözünürlüğün ilacın deri permeasyon oranını doğrudan etkilemesiyle açıklanır (Ge ve ark. 2014), çünkü sadece çözünen ilaç deriye nüfuz edebilir (Yuan ve ark. 2006, Butani ve ark. 2014). Çalışmamızda mikroemülsiyon bileşenlerinin seçiminde etkin maddelerin bu bileşenlerdeki çözünürlükleri de dikkate alındı.

Ayrıca, geliştirilen mikroemülsiyon formülasyonlarında sürfaktanların iritasyon oluşturma potansiyeli dikkate alınarak (Guinedi ve ark. 2005), deride istenmeyen yan etkilerin oluşmasını önleyebilmek için non-iyonik sürfaktanlar tercih edildi. Seçilen mikroemülsiyon formülasyonlarının tamamında kosürfaktan olarak; dermal ve transdermal ugulamalarda sıklıkla kullanılan, biyolojik olarak uyumlu, toksik olmayan, polar ve apolar çözücülerle karışabilen ve çözündürme etkisi güçlü olan Transcutol P (Güngör ve Bergişadi 2004; Hathout ve ark. 2010a; Wan ve ark. 2015) maddesi kullanıldı.

Her iki etkin madde için de çözündürme kapasiteleri en yüksek olan yağ, sürfaktan ve kosürfaktan fazı olarak sırası ile; Capryol 90, Labrasol ve Transcutol P (Tablo 4-1 ve Tablo 4-2) seçilerek "CLT (1:1)", "CLT (2:1)" ve "CLT (1:2)" kodlu mikroemülsiyonlar hazırlandı (Tablo 4-17).

Kimyasal ismi propilen glikol mono kaprilat olan Capryol 90'nın hem mikroemülsiyonlarda (Fouad ve ark. 2013) hem de nanolipit taşıyıcı sistemlerde (Pople ve Singh 2011) yağ fazı olarak kullanıldığı kayıtlıdır. Hastalıkta derinin durumu da dikkate alındığında, topikal uygulamaya yönelik formülasyon bileşiminde yer alan sürfaktan ve kosürfaktanların yüksek stabilite, düşük toksisite ve düşük iritasyon özelliklerine sahip, biyolojik olarak parçalanabilir olması önemlidir. Labrasol ve Transcutol P bu özellikleri taşıyan yüzey etkin madde ve kosürfaktan olarak kayıtlıdır (Hathout ve Elshafeey 2012).

Bazı çalışmalarda mikroemülsiyonlara yüklenen etkin maddenin yağ fazı içindeki çözünürlüğü ile deriye penetrasyonu arasında doğrudan bir ilişki olmadığı ve etkin maddenin deriden penetrasyonundaki artışının, yağ fazının deri üzerindeki etkilerinden dolayı olduğu da gösterilmiştir (Lopes 2014). Oleik asit, deriye uygulanan formülasyonlarda sıkılıkla kullanılan, penetrasyon artıcı özelliğe sahip bir bileşendir. Deri üzerindeki etki mekanizması; *stratum corneum*'daki hücrelerarası lipitlerin düzenini bozması veya lameller katı-sıvı faz ayrımı oluşturması olmak üzere iki olasıkla açıklanmıştır (Naik ve ark. 1995). Bu özelliği nedeni ile yağ fazı olarak mikroemülsiyonlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Peltola ve ark. 2003; Chen ve ark. 2004; Zhao ve ark. 2006; Tuncay ve Özer 2013; Erdal ve ark. 2016). Ayrıca, Touitou ve ark. yaptıkları çalışmada oleik asitin, *Langerhans* hücrelerini etkileyerek deri üzerinde immünosüpresan bir etki oluşturabileceğini de göstermiştir (Touitou ve ark. 2002).

Dolayısıyla formülasyonda kullanılacak bileşenlerin seçiminde fayda/risk değerlendirilmesi önemlidir (Kogan ve Garti 2006).

Bu verilere dayanarak, penetrasyon artırıcı etkisi ve AD hastalığında epidermisteki *Langerhans* hücrelerini etkileyebilmesi nedeniyle, yağ fazı "oleik asit" olan mikroemülsiyonlar da hazırlandı. Ancak, yağ fazı oleik asit olan ve sürfaktan olarak Tween 80 içeren mikroemülsiyonlarda ($OT_{80}T$, $OT_{80}T$-1, $OT_{80}T$-2, $OT_{80}T$-3 ve $OT_{80}T$-4) bir süre sonra jelleşme gözlendi. Yağ fazı oleik asit, sürfaktan veya kosürfaktan olarak Kolliphor RH içeren mikroemülsiyonlar (sırasıyla $OC_{RH}T$ veya OLC_{RH}) akışkanlık açısından yetersiz bulundu.

Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile oleik asit, Kolliphor EL ve Transcutol P içeren mikroemülsiyonlara ($OC_{EL}T$, $OC_{EL}T$-1, $OC_{EL}T$-2 ve $OC_{EL}T$-3; su tutma kapasiteleri yaklaşık olarak %30), ikinci sürfaktan olarak Labrasol eklenmesiyle hazırlanan mikroemülsiyonların (OLT-$C_{EL,}$ OLT-C_{EL}-1, OLT-C_{EL}-2) su tutma kapasitelerinin arttığı (yaklaşık olarak %40) görüldü. Elde edilen bu bulguların ışığında, sürfaktan olarak düşük toksik etkiye sahip, non-iyonik yapıdaki Labrasol (Fouad ve ark. 2013) ile non-iyonik özellikteki Kolliphor EL (Ren ve ark. 2014) içeren mikroemülsiyonlar hazırlandı.

Yağ fazı, sürfaktan ve kosürfaktan olarak sırası ile oleik asit, Tween 20 ve Transcutol P içeren mikroemülsiyonlara (OTT, OTT-1; PDI≤0,55) ikinci kosürfaktan olarak PEG 400'ün eklenmesiyle hazırlanan mikroemülsiyonlarda (OTT-PEG, OTT-PEG-1, OTT-PEG-2) partikül büyüklüğü dağılımının daha homojen olduğu (PDI≤0,22) ve formülasyonların akışkanlıklarının arttığı saptandı. Bu nedenle non-iyonik Tween 20 (Hathout ve ark. 2010a) kullanılarak mikroemülsiyonlar hem Transcutol P ile hem de non-iyonik özellikte, etkin maddelerin çözünmesine yardımcı olan PEG 400 (Ngawhirunpat ve ark. 2013) ile hazırlandı.

Bu veriler dikkate alınarak; yağ fazı oleik asit, kosürfaktanı Transcutol P, sürfaktanı Labrasol olan "OLT" kodlu mikroemülsiyon ile, sürfaktan bileşimi Labrasol ve Kolliphor EL olan "OLT-CEL" kodlu mikroemülsiyon formülasyonları hazırlandı. Aynı zamanda, yağ fazı oleik asit, sürfaktanı Tween 20, kosürfaktanı Transcutol P olan "OTT" kodlu mikroemülsiyon ile kosürfaktan bileşimi, Transcutol P ve PEG 400 olan "OTT-PEG" kodlu mikroemülsiyon formülasyonları da hazırlandı (Tablo 4-18).

Üçgen faz diyagramları, mikroemülsiyonlardaki bileşenlerin konsantrasyon aralığını belirleyebilmek için oluşturulur (Sintov ve Shapiro 2004; Zhao ve ark. 2014; Erdal ve ark. 2016). Mikroemülsiyon bölgesi, berrak ve şeffaf formülasyonların bulunduğu alan olarak tanımlanır (Constantinides ve Scalart 1997). Yukarıda açıklandığı üzere karar verilen yağ (Capryol 90 ve oleik asit), sürfaktan (Labrasol, Kolliphor EL, Tween 20) ve kosürfaktanlar (Transcutol P, PEG 400) kullanılarak üçgen faz diyagramları çizildi. Mikroemülsiyon formülasyonları sürfaktan:kosürfaktan (S:KoS) oranları 1:2, 1:1, 2:1 olarak, yağ fazının S:KoS karışımına oranı ise 1:9:, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 olacak şekilde seçildi.

Yağ fazı Capryol 90, sürfaktanı Labrasol, kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranları 1:1, 2:1, 1:2, olan mikroemülsiyonların üçgen faz diyagramlarının çizilebilmesi için kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablolar 4-10, 4-11 ve 4-12'de bu mikroemülsiyonlara ait faz diyagramları Şekil 4-6, 4-7 ve 4-8'de gösterilmektedir. Yağ fazı oleik asit, sürfaktanları Labrasol:Kolliphor EL (SI:SII= 2:1), kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranı 1:1 olan mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-13'te, faz diyagramı Şekil 4-9'da gösterilmektedir. Yağ fazı oleik asit, sürfaktanı Labrasol, kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranı 1:1 olan mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-14'te, faz diyagramı Şekil 4-10'da gösterilmektedir. Yağ fazı oleik asit, sürfaktanı Tween 20, kosürfaktanları Transcutol P:PEG 400 (KoSI:KoSII= 3:1) ve S:KoS oranı 1:2 olan mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-15'te, faz diyagramı Şekil 4-11'de gösterilmektedir. Yağ fazı oleik asit, sürfaktanı Tween 20, kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranı 1:1 olan mikromülsiyonların üçgen faz diyagramlarında kullanılan formülasyon bileşenleri ile miktarları Tablo 4-16'da, faz diyagramı Şekil 4-12'de gösterilmektedir. Elde edilen üçgen faz diyagramı verilerine dayanarak, mikroemülsiyon oluşum bölgeleri belirlendi ve etkin maddelerin yüklenmesi için mikroemülsiyon formülasyonlarının seçiminde bu alanlar da dikkate alındı.

Çözünürlük ve safsızlık çalışmaları verileri ile etkin madde yüklü olmayan mikroemülsiyonların su tutma kapasiteleri, damlacık boyutu ve dağılımları, fiziksel görünümleri dikkate alınarak, ayrıca üçgen faz diyagramları verileri değerlendirilerek

etkin madde yüklenecek “CLT (1:1)”, “CLT (2:1)” ve “CLT (1:2)” ayrıca “OLT”, “OLT-CEL”, “OTT” ve “OTT-PEG” kodlu mikroemülsiyon formülasyonları seçildi.

Seçilen mikroemülsiyonların su yüzdeleri %30-%45 aralığında değişmektedir (Tablo 4-17 ve 4-18). Topikal uygulanan mikroemülsiyonların *stratum corneum* üzerindeki hidratasyonu, söz konusu deri bariyerinden ilacın permeasyonunu da artırabilmektedir (Zhu ve ark. 2008). Dolayısıyla mikroemülsiyonlardaki su miktarı gerek hedef hastalıktaki derinin durumu gerekse ilaç moleküllerinin deriden geçirgenliği üzerindeki katkıları açısından önemlidir.

Goebel ve ark. yaptıkları çalışmada deri ile uyumlu mikroemülsiyonların hazırlanabilmesi için yağ fazının en az %5 olması gerektiğini ve sürfaktanın %30 değerini aşmaması gerektiğini bildirmişlerdir (Goebel ve ark. 2011). Tez çalışmasında seçilen mikroemülsiyonların yağ miktarları (%5≤) ve sürfaktan miktarları (≤%30) bu açıdan uygun olarak değerlendirilmiştir. [CLT (2:1) mikroemülsiyonunda sürfaktan miktarı ≤%35 olarak belirtilmiştir. Santez projesi kapsamında TR201510399 ve TR201513223 numaralarıyla patent başvurusu yapıldığı için formülasyonlar için kesin birim formül verilmemiştir.]

Tez çalışması kapsamında geliştirilmesi planlanan takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerini bir arada içeren merhem formülasyonları da önformülasyon çalışma verileri dikkate alınarak yapıldı. Tablo 3-7’de yer alan yardımcı maddeler ile farklı çözücüler değişik oranlarda kullanılarak merhem formülasyonları hazırlandı. Merhem formülasyonları çözücü olarak Transcutol P ve Capryol 90; sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu kullanılarak (“MR-TC”); çözücü olarak triasetin ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu ve/veya katı parafin-propilen glikol kullanılarak (“MR-TA”); çözücü olarak propilen karbonat ve sıvağ olarak vazelin, sıvı parafin, balmumu ve/veya katı parafin-propilen glikol (“MR-PC”) kullanılarak, etkin madde yüklemesi yapılmadan hazırlandı (Tablo 4-19, Tablo 4-20 ve Tablo 4-21). Merhemlerin fiziksel kararlılığı oda sıcaklığında 30 gün süre bekletilerek değerlendirildi. Bu süre sonunda yapılan değerlendirmede, hazırlanan merhemlerde herhangi bir faz ayrımı, erime veya renk değişimi olmadığı saptandı.

Çalışmamızda geliştirilen formülasyonlardaki takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin analizlerinde, örneklerdeki miktarlarının hesaplanması için Amerika Farmakopesi’nde (USP, 2013) takrolimus için kayıtlı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

(HPLC) yöntemi, yapılan bazı değişiklikler ile optimize edilerek kullanıldı. Geliştirilen HPLC yöntemi; takrolimus ve fusidik asitin çözünürlük çalışmaları, miktar tayini ve stabilite çalışmalarında hazırlanan örneklerdeki etkin maddelerin miktarlarının hesaplanmasında ve safsızlık analizlerinde, ayrıca, *in vitro* salım ve *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarından elde edilen örneklerdeki fusidik asit miktar tayini için kullanıldı. Bu kapsamda doğrusallık (linearity), kesinlik (precision), doğruluk/geri kazanım (accuracy), seçicilik (specificity), teşhis limiti (detection limit), miktar tayini limiti (quantification limit) ve stabilite parametreleri çalışılarak yöntem valide edildi (ICH Tripartite Guideline Q2(R1) 2005).

Takrolimusun HPLC miktar tayini yönteminin doğrusallığı elde edilen standart eğrinin (Şekil 4-13) determinasyon katsayısı (r^2 =1) (Tablo 4-23) ve uygun (<%2) RSD değerleri (Tablo 4-22) ile gösterilmiştir. Yöntemin teşhis limiti (TL= 0,0200 µg/mL) ve miktar tayini limiti (MTL= 0,0607 µg/mL) saptandı. Yöntemin validasyonu, çalışılan diğer parametreler ile de gösterildi (Tablo 4-24 – Tablo 4-27).

Fusidik asidin de HPLC miktar tayini yönteminin doğrusallığı elde edilen standart eğrinin (Şekil 4-14) determinasyon katsayısı (r^2 =1) (Tablo 4-29) ve uygun (<%2) RSD değerleri (Tablo 4-28) ile gösterilmiştir. Yöntemin teşhis limiti (TL= 0,0057 µg/mL) ve miktar tayini limiti (MTL= 0,0174 µg/mL) saptandı. Yöntemin validasyonu, çalışılan diğer parametreler ile de gösterildi (Tablo 4-30, Tablo 4-31 ve Tablo 4-34). Söz konusu HPLC yöntemi, *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında deri numunelerinden bantla soyma işlemiyle uzaklaştırılan fusidik asit miktarını belirlemek için de kullanıldığından yönteminin doğruluğu, bant ve deri örneklerinden etkin maddenin yüksek geri kazanım değerleri ile (>%90) gösterildi (Tablo 4-32 ve Tablo 4-33) ve uygun olduğuna karar verildi (Kamitani ve ark. 2013; Lapteva ve ark. 2014). Seçicilik çalışmaları ile de derinin ve bandın fusidik asit pikinin alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptandı (Şekil 4-15).

Fusidik asitin *in vitro* salım çalışmasında kullanılan HPLC miktar tayini yönteminin doğrusallığı elde edilen standart eğrinin (Şekil 4-16) determinasyon katsayısı (r^2 =1) (Tablo 4-36) ve uygun (<%2) RSD değerleri (Tablo 4-35) ile gösterildi. Yöntemin teşhis limiti (TL= 0,0389 µg/mL) ve miktar tayini limiti (MTL= 0,1178 µg/mL) saptandı. Yöntemin validasyonu çalışılan diğer paramtereler ile de gösterildi (Tablo 4-37 - Tablo 4-40).

Takrolimus içeren formülasyonların *in vitro* salım çalışması ile *in vitro* deriden penetrasyon çalışması örneklerinin analizinde ise literatürde takrolimus için kayıtlı (Goebel ve ark. 2011) LC-MS yöntemi optimize edilerek kullanıldı. *In vitro* salım çalışması örnekleri için yönteminin doğrusallığı elde edilen standart eğrinin (Şekil 4-17) determinasyon katsayısı (r^2=0,0997) (Tablo 4-42) ve (<%25,73) RSD değerleri (Tablo 4-41) ile gösterildi. Yöntemin teşhis limiti (TL= 0,6229 ng/mL) ve miktar tayini limiti (MTL=1,8877 ng/mL) saptandı. *In vitro* penetrasyon çalışması için yönteminin doğrusallığı elde edilen standart eğrinin (Şekil 4-18) nin determinasyon katsayısı (r^2=0,0993) (Tablo 4-44) ve (≤ %11,03) RSD değerleri (Tablo 4-43) ile gösterildi.

Söz konusu analitik yöntem *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında deri numunelerinden bantla soyma işlemiyle uzaklaştırılan takrolimus miktarını belirlemek için kullanıldığından yönteminin doğruluğu, bant ve deri örneklerinden etkin maddenin yüksek geri kazanım değerleri ile (>%87) gösterildi (Tablo 4-47 ve Tablo 4-48) ve uygun olduğuna karar verildi (Kamitani ve ark. 2013; Lapteva ve ark. 2014). Seçicilik çalışmaları ile de derinin ve bandın takrolimus pikinin alıkonma zamanında girişim yapmadığı saptandı (Şekil 4-19 ve Şekil 4-20). Yöntemin teşhis limiti (TL= 0,1361 ng/mL) ve miktar tayini limiti (MTL= 0,4124 ng/mL) saptandı. Yöntemin validasyonu çalışılan diğer parametreler ile de gösterildi (Tablo 4-45 ve Tablo 4-46). LC-MS-MS yönteminin uygulandığı bir başka tez çalışmasında da validasyon verilerinde hesaplanan RSD değerlerinin %2'den daha büyük olduğu ve determinasyon katsayısının r^2>0,99 görülmüştür (Anılmert 2014 pp. 99-115). Bu nedenle yöntemin validasyon bulgularında elde edilen r^2 ve RSD değerlerinin uygun olduğuna karar verildi.

Mikroemülsiyon hazırlanırken etkin maddenin formülasyona yüklenmesi ilgili farklı yaklaşımlar mevcuttur (Chen ve ark. 2006; Zhu ve ark. 2008; Hathout ve Elshafeey 2012). Çalışmamızda yağ:sürfaktan:kosürfaktan karışımında etkin maddeler çözündürüldü. Bu karışımın üzerine su, titrasyon yöntemiyle ilave edildi. Daha sonra sistemin dengeye gelmesi için oda sıcaklığında 720 rpm hız ile 12-18 saat manyetik karıştıcıda (IKA-Werke, RT 15) karıştırıldı.

Etkin maddeler takrolimus (USP 36, 2013) ve fusidik asitin (EP 8.0, 2012) moleküler yapılarında oksidasyona açık grupların olması nedeniyle mikroemülsiyonlara antioksidan madde/ler; mikroorganizma üremesine karşı da antimikrobiyal koruyucu madde eklendi. Söz konusu yardımcı maddelerin formülasyon içindeki etkinliğini

araştırmak ve oranlarını belirlemek için önformülasyon çalışmaları verilerine göre sürfaktan miktarı daha az ve su miktarı daha fazla olan "CLT(1:2)" kodlu mikroemülyon formülasyonu seçildi. Yağ fazı Capryol 90, sürfaktanı Labrasol, kosürfaktanı Transcutol P ve S:KoS oranı 1:2 olan bu mikroemülsiyon, optimizasyon çalışmaları için su ile titrasyon yöntemi esas alınarak ve mekanik karıştırıcı (Heidolp RZR 20151 Control) kullanılarak hazırlandı. Hazırlanan formülasyonların stabiliteleri kısa süreli olarak izlendi.

İlk olarak, takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin yüklendiği ve topikal formülasyonlarda kullanılabilen yardımcı maddelerden antioksidan madde olarak butil hidroksi anisol (BHA) (Rowe ve ark. 2009 p.73) ve antimikrobiyal koruyucu madde olarak benzoik asit (Rowe ve ark. 2009 p.61) içeren CLT (1:2)-A kodlu mikroemülsiyon hazırlandı. Formülasyonun kimyasal ve fiziksel stabilitesi 40±2˚C sıcaklık %75±5 bağıl nem koşulunda 3 ay süreyle izlendi.

Formülasyonun fiziksel stabilitesinin uygun olduğu, pH değeri ile damlacık boyutu ve dağılımı bulguları ile saptandı (Tablo 4-50). Ancak, formülasyonun zorlayıcı koşullara maruz bırakılması toplam safsızlık miktarında artışa neden oldu (Tablo 4-49). Etkin maddelerin formülasyonlardaki geri kazanım bulguları fusidik asit için uygunken (sırasıyla başlangıç, 1. 2. 3. ay için %102,5 ; %99,5 ; %99,5 ; % 98,0) takrolimus için düşük olduğu (sırasıyla başlangıç, 1. 2. 3. ay için %106,4 ; %87,8 ; %83,7 ; %78,4) görüldü.

Daha sonra, mikroemülsiyon bileşimindeki BHA miktarı artırıldı ve ayrıca disodyum etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) eklenerek CLT (1:2)-B kodlu mikroemülsiyon formülasyonu hazırlandı. Formülasyonun kimyasal ve fiziksel stabilitesi 40±2˚C sıcaklık %75±5 bağıl nem koşulunda 3 ay süreyle izlendi.

Önceki çalışma bulgularına benzer şekilde formülasyonun zorlayıcı koşullara maruz bırakılmasının toplam safsızlık miktarında artışa neden olduğu, ancak söz konusu artışın, daha önceki CLT (1:2)-A formülasyonuna göre daha düşük olduğu görüldü (Tablo 4-51). Aynı şekilde, formülasyondaki fusidik asit geri kazanım bulguları uygun bulunurken (sırasıyla başlangıç, 1. 2. 3. ay için %105,5 ; %98,5 ; %98,0 ; %97,5) takrolimus içinse yine düşük olduğu (sırasıyla başlangıç, 1. 2. 3. ay için %98,6 ; %91,8 ; %89,5 ; %82,3) ancak ilk formülasyona göre iyileşme olduğu saptandı. Formülasyonun fiziksel stabilitesinin etkilenmediği görüldü (Tablo 4-52).

Formülasyon optimizasyonu için son olarak, farklı antioksidanların ilavesi ve formülasyonda kullanılan antioksidan miktarının artırılması yolu izlendi. Bu kapsamda topikal preparatlarda kullanılan butil hidroksi toluen (BHT) (Rowe ve ark. 2009 p.75) ve Vitamin E (Rowe ve ark. 2009 p.31) formülasyon bileşimine eklendi.

Yapılan çalışmalar doğrultusunda etkin maddelerin mikroemülsiyon içinde stabil kalabileceği antioksidan, koruyucu ve şelat yapıcı maddeler ile bunların yüzdeleri belirlendi. Buna göre takrolimus ve fusidik asit etkin maddelerinin bir arada yüklendiği ve optimizasyonu tamamlanan mikroemülsiyonların kodları, formülasyon bileşenleri ve yüzdeleri Tablo 4-53'te gösterilmiştir.

Takrolimus yüklü mikroemülsiyon formülasyonlarına da, optimizasyon çalışmaları kapsamında belirlenen antioksidanlar ve antimikrobiyal koruyucu madde ilave edilerek optimize edildi (Tablo 4-54).

Takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarının optimizasyonu için; farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan merhemlerin stabilitelerinin 40±2˚C sıcaklık %75±5 bağıl nem koşullarında izlenerek değerlendirilmesine karar verildi. İlk olarak formülasyon bileşimi Tablo 4-19'da yer alan MR-TC-5 kodlu merhem formülasyonu takrolimus ve fusidik asit birlikte yüklenerek hazırlandı ve stabilitesi izlendi. Bulgulara göre etkin maddelerin geri kazanımlarında azalma olduğu ve toplam safsızlık miktarında ise artış olduğu görüldü (Tablo 4-55). Bu durumun formülasyonun zorlayıcı koşullara maruz bırakılmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Ayrıca, takrolimustaki azalmanın daha fazla olmasının, hazırlama aşamasında çözücü amaçlı kullanılan yardımcı maddelere (Capryol 90 ve Transcutol P) uygulanan prosesinden dolayı olabileceği sonucuna varıldı. (Merhem formülasyonları için Santez projesi kapsamında TR201510398 numarası Patent başvurusu yapıldığından üretim işlem basamakları ayrıntılı olarak verilmemiştir.)

Merhem formülasyonlarının optimizasyonu için MR-TC-5 kodlu formülasyona antioksidan madde olarak BHA ilave edildi. Formülasyonun yüksek sıcaklık değerlerindeki fiziksel stabilitesini artırmak için bileşimine katı parafin eklendi. Formülasyondaki sıvı parafin miktarı artırıldı, vazelin miktarı azaltıldı ve hazırlama prosesi değiştirildi. Yapılan optimizasyonlarla takrolimus ve fusidik asit yüklü MR-TC-8 kodlu merhem formülasyonu hazırlandı. Aynı zamanda, formülasyon bileşimi Tablo 4-20'de yer alan MR-TA-5 kodlu merhem formülasyonu, takrolimus ile fusidik asit

yüklenerek ve BHA eklenerek hazırlandı. MR-TC-8 ve MR-TA-5 kodlu formülasyonların kimyasal ve fiziksel stabiliteleri 40±2˚C sıcaklık %75±5 bağıl nem koşulunda 1 ay süreyle izlendi. Merhemlerde etkin maddelerin geri kazanımlarında azalma olduğu ancak söz konusu azalmanın bir önceki merhem formülasyonuna (MR-TC-5) göre daha düşük olduğu görüldü (Tablo 4-56 ve Tablo 4-57). Sonuç olarak, yapılan optimizasyon çalışmaları ile etkin maddelerin stabilitelerinde artış sağlandığı saptandı.

Merhem formülasyonlarının optimizasyon çalışmalarına formülasyon bileşimlerine farklı antioksidanlar (BHT ve Vitamin E) eklenerek ve/veya formülasyon bileşenlerinin oranları değiştirilerek devam edildi. Bu kapsamda takrolimus ve fusidik asit yüklü, çözücü olarak Transcutol P ile Capryol 90 kullanılan "MR-TC-9" kodlu merhem formülasyonu ile çözücü olarak Propilen karbonat kullanılan MR-PC-5 merhem formülasyonu hazırlandı (Tablo 4-58).

Etkin madde yüklü mikroemülsiyonların karakterizasyon çalışmaları yapılarak fizikokimyasal özellikleri belirlendi. Bunun için mikroemülsiyonların fiziksel görünüşü incelendi. Refraktif indeks, pH, iletkenlik, damlacık boyutu, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli ve viskozite ölçümleri yapıldı. Fiziksel stabiliteleri değerlendirildi. Ayrıca, polarize ışık mikroskobu ile incelendiler ve hacim fraksiyonları hesaplandı.

Mikroemülsiyonlardan yağ fazı Capryol 90 olan formülasyonların renksiz, saydam, homojen olduğu ve yağ fazı oleik asit olan formülasyonların kullanılan yağdan dolayı sarımtrak renkte, saydam, homojen olduğu gözlendi. Formülasyonlar hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında incelendiğinde bulanıklık ve faz ayrımı görülmedi.

Mikroemülsiyonlarda yapılan refraktif indeks (RI) ölçümleri formülasyonların saydamlığı ile ilgili değerlendirmelerin yapılmasını sağlar (Silva ve ark. 2009). Mikroemülsiyon formülasyonundaki yağ ve sürfaktan miktarının refraktif indeks değerlerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark. 2004). Çalışmamızda takrolimus ve fusidik asit yüklü, sürfaktan miktarları CLT (2:1) > CLT (1:1) > CLT (1:2) şeklinde sıralanan mikroemülsiyonların RI değerleri sırasıyla olarak 1,415 ; 1,409 ve 1,404 ölçülerek benzer bir bulgu bulundu (Tablo 4-59). Takrolimus yüklü mikroemülsiyonlarda da sürfaktan miktarıyla orantılı olarak RI sonuçlarının arttığı görüldü. Ayrıca, bu mikroemülsiyonlarda su miktarı daha yüksek olan OLT-CEL ve OTT-PEG için RI değerleri sırasıyla 1,405 ve 1,410 olarak ; su miktarı daha düşük olan OLT ve OTT için RI değerleri sırasıyla 1,415 ve 1,418 olarak bulundu (Tablo 4-60).

Dolayısıyla artan su miktarıyla RI değerlerinde düşüş saptandı. Aynı zamanda mikroemülsiyonlara etkin madde/ler yüklenmesiyle RI değerlerinin değişmediği görüldü (Erdal ve ark. 2016).

Mikroemülsiyon formülasyonlarının pH değerlerinin derinin normal pH değerinden çok yüksek veya düşük olmasının deride iritasyona yol açabildiği bilinmektedir (Ge ve ark. 2014). Bu nedenle, genelikle topikal formülasyonların pH aralığı 5-7 arasında tercih edilmektedir (Brown ve ark. 2012 p.268). AD gibi enflamasyonlu deri hastalıklarında, derinin pH değerinin alkaliye kayması (Jensen-Michael J. ve ark 2006 p.572) durumunda ise daha düşük pH değerlerindeki formülasyonların da deri tarafından tolere edilebileceği bilinmektedir (Brown ve ark. 2012 p.268).

Aynı zamanda, formülasyonun pH değeri etkin maddelerin stabilitesini de etkileyebilmektedir. Takrolimusun düşük pH değerinde (pH 4,8) daha stabil olduğu gösterilmiştir (Goebel ve ark. 2011). Çalışmamızda optimize edilen mikroemülsiyonların etkin maddeler yüklenmeden pH değerleri 4,25-5,11 aralığında iken; etkin madde/ler yüklendiğinde ise pH 4,09-5,21 aralığında olduğu saptandı (Tablo 4-61 ve Tablo 4-62). Formülasyonlara sadece takrolimus yüklendiğinde, mikroemülsiyonun pH değerinin hafif bir artış gösterdiği; her iki etkin madde ile yüklendiklerinde ise hafif bir azalma olduğu görüldü. Elde edilen stabilite verileri ve hedef hastalıkta derinin durumu dikkate alınarak, optimize edilen formülasyonların pH aralığı kabul edilebilir olarak değerlendirildi.

İletkenlik ölçümleri mikroemülsiyonların sürekli fazının değerlendirilmesi için yapılmaktadır (Peltola ve ark. 2003). Dış fazı su olan mikroemülsiyonların elektriksel iletkenlikleri yüksek değer gösterir (Hathout ve ark. 2010a). Çalışmamızda boş mikroemülsiyonların iletkenlik ölçüm sonuçları 13,53- 49,85 µS/cm aralığında etkin madde/ler yüklü olanların ise 12,23-49,17 µS/cm aralığında olduğu saptandı (Tablo 4-63 ve Tablo 4-64).

Genellikle formülasyon bileşimindeki su miktarı arttıkça iletkenlik değerleri de artar (Hathout ve ark. 2010a). Çalışmamızda takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların bileşimindeki su miktarı CLT (1:2) > CLT (2:1) > CLT (1:1) olarak sıralanırken, formülasyonların iletkenlik değerleri CLT (2:1) > CLT (1:2) >CLT (1:1) olarak bulundu. Dolayısıyla formülasyon bileşiminde yer alan sürfaktan miktarının da

önemli olduğu sonucuna varıldı [Sürfaktan miktarı CLT (2:1) > CLT (1:2)]. Söz konusu bilgiyle benzerlik çalışmamızdaki OLT-CEL ve OLT mikroemülsiyonları ile OTT-PEG ile OTT mikroemülsiyonları arasında saptandı. Etkin madde takrolimus yüklü iken su yüzdesi % 42,18 olan OLT-CEL ile su yüzdesi % 32,08 OLT mikroemülsiyonların iletkenlik değerleri sırasıyla 32,02 µS/cm ve 17,30 µS/cm olarak ölçüldü. Benzer şekilde, su yüzdesi % 40,98 olan OTT-PEG ile su yüzdesi % 32,08 OTT mikroemülsiyonların iletkenlik değerleri sırasıyla 49,17 µS/cm ve 44,87 µS/cm olarak ölçüldü.

Aynı zamanda, OLT-CEL formülasyonunun su yüzdesinin OTT mikroemülsiyonundan yüksek olmasına (%42,18 > %32,08) rağmen iletkenlik değerinin daha düşük (37,02 µS/cm < 44,87 µS/cm) olduğu görüldü. Bu sonucun mikroemülsiyonlarda yer alan yardımcı maddelerin kimyasal yapılarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Djekic ve Primorac, yağ fazı izopropil miristat, sürfaktanı Labrasol olan 7 farklı kosürfaktan ile hazırladıkları mikroemülsiyonlarda su miktarlarını birbirine yakın yüzdelerde tutarak (%25) iletkenlik değerlerini ölçmüş ve genel olarak <25 µS/cm olarak bulmuşlardır. Kosürfaktan olarak Plurol oleik ve Plurol izostearik içeren mikroemülsiyonlarda su yüzdeleri yüksek olmakla birlikte (yaklaşık %35 ve %36) iletkenlik değerleri oldukça yüksek (yaklaşık 217 µS/cm ve 238 µS/cm) bulunmuştur. Bu durum kosürfaktanların sürfaktan ile sinerjik bir etki oluşturarak kondüktiviteyi artırdığı yönünde açıklanmıştır (Djekic ve Primorac 2008). Dolayısyla OTT-PEG ve OTT formülasyonlarında kosürfaktan Transcutol P ve sürfaktan Tween 20 arasında böyle bir sinerjik etki olduğu düşünülebilir.

İletkenlik çalışmaları kapsamında yağ fazına eklenen su fazı ile değişen iletkenliği değerlendirmek için mikroemülsiyonların yağ:sürfaktan:kosürfaktan karışımları % 0,9 NaCI çözeltisiyle titre edildi (Zhang ve Michniak-Kohn 2011). Benzer bir çalışma %0,1 NaCI çözeltisi kullanılarak da yapılmıştır (El Maghraby ve ark 2014). Bu çalışmalarda elde edilen iletkenlik eğrisi düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç bölüme ayrılır. Bu bölgeler sırasıyla S/Y, geçişli (*bicontinuous*) ve Y/S mikroemülsiyonlarını temsil eder. S/Y bölgesi küçük ve lineerdir. Su miktarı arttıkça damlacıklar birbirlerine bağlanarak kümelenir ve doğrusallık bozulur. Eğride, lineer bölümden lineer olmayana geçiş noktası perkolasyon eşiği olarak adlandırılır. Mikroemülsyonun mikroyapısı değişmeye başlayarak geçişli yapı oluşur. Su içeriği arttıkça yapı değişerek Y/S mikroemülsiyonları meydana gelir (Zhang ve Michniak-Kohn 2011; El Maghraby ve ark 2014).

Çalışmamızda optimize edilen CLT (1:2), CLT (2:1) , CLT (1:1) ayrıca OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyonlar için belirtilen geçişler gösterildi. Su fazına bağlı değişen iletkenlik ölçümleri grafik ile değerlendirildi. (Şekil 4-21 – Şekil 4-27).

Mikroemülsiyonların küçük damlacık boyutuna sahip olmasının deri ile temas eden yüzey alanın artmasını sağlayarak deriden geçişi olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (Paolino ve ark. 2002; Peltola ve ark. 2003). Çalışmamızda optimize edilen mikroemülsiyonların boş ve etkin madde/ler yüklü olarak damlacık boyutları <10 nm olarak ölçüldü (Tablo 4-72 ve Tablo 4-73). Literatürde mikroemülsyonlara etkin madde yüklenmesiyle damlacık boyutlarında artış olduğu bildirilmiştir. (Sintov ve Shapiro 2004). Çalışmamızda genel olarak, etkin madde yüklenmesiyle damlacık boyutlarında az da olsa bir artış görüldü (Tablo 4-72 ve Tablo 4-73).

Polidispersite indeksinin (PDI) sıfıra yakın olması mikroemülsiyon damlacıklarının homojen ve oldukça dar bir dağılıma sahip olduğunu göstermektedir (Patel ve ark. 2013). Çalışmamızda mikroemülsiyonların boş halde ve etkin madde/ler yüklü olarak PDI değerleri ölçüldü. Mikroemülsiyon formülasyonların PDI değerleri 0,28'ten küçük bulundu (Tablo 4-72 ve Tablo 4-73). Elde edilen bu verilere dayanarak mikroemülsiyonların damlacık boyutu dağılımlarının homojen olduğuna karar verildi. Sadece OTT formülasyonunun PDI değerinin boş ve yüklü olarak PDI değerleri sırasıyla 0,528 ve 0,530 olarak bulundu ve verilerin literatürle uyumlu olduğu görüldü (Hathout ve ark. 2010a).

Çalışmamızda mikroemülsiyonların boş ve etkin madde/ler yüklü olarak zeta potansiyelleri ölçüldü. Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonların sıfır bölgesinde negatif işaretli ve takrolimus yüklü mikroemülsiyonların sıfır bölgesinde pozitif işaretli (OTT-PEG hariç) olarak bulundu (Tablo 4-74 ve Tablo 4-75). Mikroemülsiyonlar termodinamik bakımdan kararlı sistemlerdir ve zeta potansiyel ölçümlerinden elde ettiğimiz sonuçlar, non-iyonik sürfaktan içeren mikroemülsiyonların yüklü olmadığı (Boonme ve ark. 2016) ve stabilitesinin zeta potansiyel değerine bağlı olmadığı (Aggarwal ve ark 2013) bilgileriyle uyumlu bulunmuştur.

Mikroemülsiyonların viskoziteleri, sürfaktan filmin kalınlığı ve damlacık büyüklükleri hakkında bilgi verir (Lawrencea ve Rees 2000). Viskozite değerleri, formülasyon bileşenlerine ve bu bileşenlerden özellikle sulu faza bağlıdır (Moulik ve Paul 1998). Çalışmamızda mikroemülsiyonların boş ve etkin madde/ler yüklü olarak

viskoziteleri ölçüldü. Takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonlarda su içeriği arttığında viskozite değerlerinin düştüğü gözlendi (Tablo 4-76). En yüksek viskozite değeri sırasıyla 54,06 cp ve 55,62 cP değerlerinde, boş ve takrolimus yüklü OTT formülasyonunda saptandı (Tablo 4-77). Daha yüksek su içeriğine sahip OTT-PEG (%40,98) mikroemülsiyonunun viskozite değerinin OTT'ye göre daha düşük olduğu görüldü; bu formülasyonun boş ve etkin madde yüklü olarak viskozitesi sırası ile 46,05 cP ve 44,55 cP olarak ölçüldü (Tablo 4-77). Bu bulgu, viskozitenin su içeriğiyle birlikte sürfaktan:kosürfaktan oranına da bağlı olduğunu göstermektedir. Moghimipour ve ark. yaptıkları çalışmada artan su miktarı ve S/CoS oranının viskoziteyi artırdığını belirtmişlerdir (Moghimipour ve ark 2013).

Mikroemülsiyonlar izotropik yapı gösterdikleri için (Kogan ve Garti 2006; Santos ve ark. 2008) uzayda belirli bir yönelim göstermemekte ve polarize ışık mikroskobu ile incelendiklerinde karanlık görüntü vermektedirler. Çalışmamızda optimize edilen formülasyonlar, polarize ışık mikroskobu ile incelendiklerinde karanlık görüntü verdiklerinden izotropik yapıları kanıtlanmıştır.

Mikroemülsiyonların fiziksel stabilitelerin değerlendirilmesi için santrifüj işlemi ile dondurma-çözme döngüsü, üç defa olacak şekilde (24 saat oda sıcaklığında [22-25°C] ve 24 saat derin dondurucuda [-18°C] bekletme) uygulandı. Formülasyonlarda faz ayrımı oluşmadı ve homojenitede bir değişiklik gözlenmedi. Mikroemülsiyonların stabil olduğuna karar verildi.

Shukla ve ark. mikroemülsyonlarda hacim fraksiyon sabitinin $0,2 < \Phi < 0,4$ aralığında olmasıyla kararlı ve kesin şekilli damlacıklara sahip formülasyonların hazırlanabileceği belirtmiştir (Shukla ve ark. 2003b). Bu bilgiye dayanarak seçilen formülasyonlarda hacim fraksiyonu (Φ) hesaplandı. CLT (1:1) CLT (2:1) ve CLT (1:2) formülasyonlarını Φ değerleri sırasıyla 0,37; 0,41 ve 0,23 olarak bulundu. OLT-CEL ve OTT-PEG için Φ değeri 0,23 olarak OLT ve OTT için 0,37 olarak bulundu. Elde edilen sonuçlara göre mikroemülsiyonların stabil ve kesin şekilli olduğuna karar verildi.

Derinin tabakalarındaki takrolimus ve fusidik asit miktarlarını saptamak için tüm kalınlıkta domuz derisi kullanılarak *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları yapıldı. Çalışmalarda, geliştirilen takrolimus ve fusidik asit yüklü mikroemülsiyonlar [CLT (1:1), CLT (2:1) ve CLT (1:2)] ile tek başına takrolimus yüklü mikroemülsiyonların (OLT-CEL, OLT, OTT ve OTT-PEG) *in vitro* koşullarda deriden penetrasyonu, pazarda

bulunan ticari ürünler Protopic® merhem (takrolimus içerir) ve Fucidin® krem (fusidik asit içerir) ile karşılaştırmalı olarak incelendi.

Lapteva ve ark., takrolimus yüklü polimerik misel formülasyonlarının domuz derisinden *in vitro* salım çalışmalarında 12. saat ve 24. saat örneklerindeki takrolimus miktarlarını karşılaştırmış ve istenmeyen yan etkileri önlemek için çalışma süresini 12 saat olarak belirlemişlerdir (Lapteva ve ark. 2014). Bu bilgiye dayanarak çalışmamızda *in vitro* penetrasyon çalışma süresi 12 saat olarak belirlendi.

Bantla soyma yöntemi *stratum corneum* tabakasının girişimsel olmayan bir prosedürle uzaklaştırılması ve örneklenmesi işlemidir (Wiedersberg ve Nicoli 2012 p.109). Bu teknikle topikal formülasyon şekillerinin deri tabakalarındaki birikimleri araştırılmaktadır (Erdal ve ark. 2014; Gürbüz ve ark. 2015; Erdal ve ark. 2016). Bu yöntemde, topikal uygulanan tüm ilaçların, *stratum corneum*'un uzaklaştırılması ile *stratum corneum*'daki ve derinin daha derin tabakalarındaki miktarları kantitatif olarak saptanabilmektedir (Wiedersberg ve Nicoli 2012 pp.109-110).

In vitro penetrasyon çalışması sonunda; uygulama yapılan deri yüzeyindeki formülasyon fazlası kağıt peçete yardımıyla tamamen artık kalmayacak şekilde uzaklaştırıldı. Daha sonra derilere ardışık olarak 20 kez yapışkan bant (Scotch Book Tape 3M, 845, 3.8x4 cm) ile soyma işlemi uygulandı. Bantlar gruplar halinde, canlı *epidermis+dermis* ise ayrı olarak tüplere alındı. Tüm örneklerin asetonitril ve su karışımı (70:30; h:h) ile ektraksiyon yapıldı. *Stratum corneum*'daki (20 banttaki toplam etkin madde miktarı, $\mu g/cm^2$) ve canlı *epidermis+dermis* tabakalarında saptanan etkin maddelerin miktarları analiz edildi (Tablolar 4-78, 4-79 ve 4-80 ile Şekiller 4-28, 4-29 ve 4-30).

Takrolimus ve fusidik asit yüklü CLT (1:2) mikroemülsiyonunun 12 saat penetrasyon çalışması sonunda; takrolimusun *stratum corneum*'a penetre olan, canlı *epidermis+dermis* tabakalarında lokalize olan ve toplam deride biriken miktarları sırası ile 7,92±1,12 $\mu g/cm^2$, 2,59±0,45 $\mu g/cm^2$, 10,51±1,23 $\mu g/cm^2$ olarak saptandı. Bu değerler ile takrolimusun derideki birikiminin her iki etkin maddenin yüklü olduğu diğer mikroemülsiyonlardan [CLT (1:1) ve CLT (2:1)] ve Protopic® merhemden anlamlı derecede farklı olduğu bulundu ($p < 0,05$). Diğer taraftan, CLT (1:1) ve CLT (2:1) kodlu mikroemülsiyonlar ile Protopic® merhemden takrolimusun, *stratum corneum* ve canlı *epidermis+dermis* tabakaları ile toplam derideki penetrasyonları arasında anlamlı bir fark

bulunmadı p>0,05). Benzer şekilde fusidik asidin de *stratum corneum* ve canlı *epidermis+dermis* tabakaları ile toplam derideki birikimi aynı formülasyon [CLT (1:2)] için diğer mikroemülsiyonlardan [CLT (1:1) ve CLT (2:1)] ve Fucidin® kremden daha yüksek olarak saptandı (p <0,05).

Aynı zamanda, canlı *epidermis+dermis* tabakalarında lokalize olan fusidik asidin miktarları karşılaştırıldığında; sıralama CLT (1:2) > CLT (1:1) > CLT (2:1) > Fucidin® krem şeklinde (sırasıyla 65,07±4,27 μg/cm^2 > 26,22±5,46 μg/cm^2 > 19,53±2,57 μg/cm^2 > 17,72±3,29 μg/cm^2) bulundu. Bu bilgilere göre de CLT (1:1) mikroemülsiyonundan lokalize olan fusidik asit miktarının CLT (2:1) ve konvansiyonel ürüne göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (p <0,05).

Takrolimus ve fusidik asit yüklü CLT (1:2) mikroemülsiyonunun derideki ilaç lokalizasyonunu artırması, penetrasyon artırıcı etkisi olduğu bilinen (Güngör ve Bergişadi 2004; Trommer ve Neubert 2006) ve formülasyon bileşiminde kosürfaktan olarak kullanılan Transcutol P ile açıklanabilir. CLT (1:1) ve CLT (2:1) mikroemüsiyonlarında da kosürfaktan olarak Transcutol P yer almakla birlikte miktarı daha düşüktür. Aynı zamanda formülasyonların viskozite (Tablo 4-76) bulguları karşılaştırıldığında CLT (1:2) mikroemülsiyonunun vizkozitesinin daha düşük olduğu görülmektedir (p<0,001). Düşük vizkozite değeri etkin maddenin formülasyon içinde daha hareketli olmasına yol açarak daha hızlı salımını sağlar (Butani ve ark. 2014). Dolayısıyla aynı inkübasyon süresinde CLT (1:2) mikroemülsiyonundan serbestleşerek deriye penetre olan etkin maddelerin miktarlarının daha fazla olmasında viskozite değerlerinin de etkili olduğu düşünebilir.

Takrolimus yüklü OLT-CEL ve OLT mikroemülsiyonlarının 12 saat penetrasyon çalışması sonunda canlı *epidermis+dermis* tabakalarına penetre olan takrolimusun miktarları sırasıyla 2,95±0,96 μg/cm^2 ve 2,26±0,96 μg/cm^2 olarak Protopic® merhemden (1,89±0,43 μg/cm^2) daha yüksek saptandı ancak istatistiksel açıdan bu fark anlamlı bulunmadı (p>0,05). Aynı mikroemülsiyonlarda *stratum corneum*'a ve toplam deriye penetre olan takrolimus miktarı ise Protopic® merhemden anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0,05). Goebel ve ark. hazırladıkları mikroemülsiyonlarda takrolimusun deri permeasyonundaki artışın nedenlerinden birinin, formülasyonlarında yer alan penetrasyon artırıcıların (1,2-alkandioller) etkisi olduğunu belirtmişlerdir (Goebel ve ark. 2011). Dolayısı ile; çalışmamızda hazırlanan mikroemülsiyonların deride daha yüksek ilaç lokalizasyonuna sahip olması formülasyon bileşiminde yer alan penetrasyon artırıcı

özellikteki (Oleik asit, Labrasol ve Transcutol P) maddelerden (Hathout ve Elshafeey 2012) kaynaklı olduğu düşünülebilir.

Aynı zamanda, termodinamik aktivite viskozite olarak da ifade edilebilir yani düşük viskoziteli taşıyıcılar içinde ilacın hareketliliği artar, bu durumda da ilaç moleküllerinin deriden permeasyonu artabilmektedir (Zhu ve ark. 2008). Bu nedenle, optimize edilen mikroemülsiyonların pazardaki ticari ürün Protopic® merhemden çok daha düşük viskozite değerlerine sahip olmaları nedeniyle mikroemülsiyonlardan takrolimusun salımını ve derideki lokalizasyonunu artırmış olabileceği de düşünülmektedir.

Takrolimus yüklü OTT-PEG ve OTT mikroemülsiyonlarının 12 saat penetrasyon çalışması sonunda canlı *epidermis+dermis* tabakalarına penetre olan takrolimusun miktarları sırasıyla 4,43±0,32 µg/cm^2 ve 2,92±0,44 µg/cm^2 olarak Protopic® merhemden (1,89±0,43 µg/cm^2) anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Bu durumun daha önce de açıklandığı gibi formülasyon bileşiminde yer alan penetrasyon artırıcı maddelerin (Hathout ve Elshafeey 2012) ve viskozitenin etkisi ile (Zhu ve ark. 2008) olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bununla birlikte, OTT-PEG mikroemülsiyonundan takrolimusun deri penetrasyonunun, OTT mikroemülsiyonundan anlamlı decede yüksek olması OTT-PEG'de kullanılan PEG-400'ün Transcutol P ile sinerjik bir etki oluşturmasından kaynaklanabilir. Mura ve ark. hidrofilik jel formülasyonlarda penetrasyon artıcı olarak Transcutol P maddesinin tek başına ve Propilen glikol ile birlikte kullanarak, etkin madde klonazepamın deri permeasyonuna etkilerini karşılaştırmıştır. Çalışmada, Transcutol P ile permeasyonun artığını ve Propilen glikol ile birlikteliğinde ise artışın daha fazla olduğunu göstermişlerdir (Mura ve ark. 2000).

Optimum bir takrolimus formülasyonundan beklenen tedavi etkinliği; uygulanan formülasyonun hem etkin maddeyi *epidermis* ve *dermis*te bulunan *T* hücrelerine ulaştırması, hem de minumum sistemik etki göstererek yan etkilere yol açmamasıdır (Lapteva ve ark. 2014). Çalışmamızda hazırladığımız mikroemülsiyonların (takrolimus ve fusidik asit içeren ve takrolimus içeren) da gerek deri penetrasyonlarının konvansiyonel ürünlere (Protopic® merhem ve Fucidin® krem) göre daha yüksek olması gerekse reseptör fazda etkin maddelerin kantitatif değerlendirilen hassasiyeti yüksek bir analitik yöntem ile saptanmaması bu yaklaşımın sağlandığını göstermektedir.

Dermal olarak uygulanan formülasyonların deri üzerindeki etkileri ATR-FTIR analizleri ile *in vitro* koşullarda incelenerek araştırılabilir (Hathout ve ark. 2010b). Bu kapsamda, dermatom edilen domuz derisinin dorsal bölgesi Franz difüzyon hücrelerine yerleştirilerek *in vitro* penetrasyon çalışmaları koşullarında çalışıldı. İnkübasyon süresi sonunda derilerin üzerinde kalan formülasyon fazlası kağıt peçete yardımıyla tamamen uzaklaştırılarak her bir deri kesiti ATR-FTIR ile analiz edildi.

Deri lipitlerinden kaynaklanan CH_2 simetrik (2850 cm^{-1}) ve CH_2 asimetrik (2920 cm^{-1}) gerilme bantlarının absorbansları *stratum corneum* hücrelerarası lipit zincirlerin belirli bir düzende olduğunu gösterir. Söz konusu bantların dalga numaralarının daha yüksek değerlerde saptanması (blue shift) lipit alkil zincirlerinin düzensizlik derecesinin arttığını gösterir (Hathout ve ark. 2011; Schwarz ve ark. 2012; Erdal ve ark. 2014 p.113).

Uygulanan formülasyonların deri üzerindeki etkilerini karşılaştırabilmek için formülasyon uygulaması yapılmayan deri (kontrol derisi) ATR-FTIR analiziyle incelendi, asimetrik ve simetrik gerilme bantları sırasıyla 2919,31±0,18 cm^{-1} ve 2851,54 ±0,21 cm^{-1} olarak kaydedildi. Takrolimus ve fusidik asit yüklü CLT (1:1), CLT (2:1) ve CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyonların uygulanmasından sonra hem simetrik hem de asimetrik gerilme bantlarının dalga numaralarınının kontrol derisine göre daha yüksek değerlere kaydığı görüldü (Tablo 4-81). Söz konusu mikroemülsiyonlar arasında en yüksek kayma değerlerinin, *in vitro* deriden penetrasyon çalışmalarında etkin maddelerin deri lokalizasyonlarının (*stratum corneum,* canlı *epidermis+dermis* ve toplam deri) en fazla olduğu "CLT (1:2)" kodlu mikroemülsiyonunda (asimetrik gerilme bandı 2923,54 ±0,35 cm^{-1} ve simetrik gerilme bandı 2854,38 ±2,16 cm^{-1}) tespit edildi. Bulgular istatiksel olarak değerlendirildiğinde ise CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyonun asimetrik gerilme bandındaki değişimin kontrol derisinden ve CLT (2:1) mikroemülsiyonundan fazla olması anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Takrolimus yüklü OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyonların ATR-FTIR analiz verileri değerlendirildiğinde; bütün mikroemülsiyonların hem simetrik hem de asimetrik gerilme bantlarının daha yüksek değerlere kaydığı görüldü (Tablo 4-81). Değişimler istatiksel açıdan değerlendirildiğinde OLT mikroemülsiyonunun hem asimetrik (2923,12±0,54 cm^{-1}) hem de simetrik (2855,53 ±0,25 cm^{-1}) bantlarındaki değişimler kontrol derisine göre anlamlı bulundu ($p<0,05$). Aynı zamanda, OLT-CEL mikroemülsiyonunda sadece asimetrik gerilme bandında

(2923,22 ±1,65 cm^{-1}) ve OTT-PEG mikroemülsiyonunda ise sadece simetrik gerilme bandında (2856,69 ±1,15 cm^{-1}) ölçülen değişimler kontrol derisine göre anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Her iki etkin maddeninin de piyasadaki ürünleri (Protopic® merhem ve Fucidin® krem) asimetrik ve simetrik gerilme bantlarında anlamlı bir değişme meydana getirmedi ($p>0,05$).

Elde edilen bulgular mikroemülsiyonların formülasyon bileşiminde yer alan Oleik asit, Transcutol P ve Labrasol veya Tween 20 yardımcı maddelerinin etkisiyle açıklanabilir. Söz konusu maddelerin kimyasal yapılarında bulunan oksijen, seramitlerin baş gruplarıyla tercihen hidrojen bağı yaparak lipit çifte tabakada yanal/boyuna (lateral/transverse) bulunan hidrojen bağlarının parçalanmasına neden olurlar (Hathout ve ark. 2011; Hathout and Elshafeey 2012).

Topikal bir formülasyona yüklenen etkin maddenin derideki penetrasyon derinliği veya yayılabilirliği, etkin maddeye benzer lipofilitede olan ve flüoresan veren model bir boyanın formüle yüklenmesinden sonra konfokal mikroskop (CLSM) ile görüntüleme çalışması yapılarak değerlendirilebilir (Hathout ve ark. 2011; Lapteva ve ark. 2014; Gürbüz ve ark. 2015).

CLSM çalışması için mikroemülsiyonların *in vitro* deriden penetrasyon çalışma bulguları dikkate alındı. Bu doğrultuda; optimize edilen mikroemülsiyon formülasyonları arasından; hem takrolimus hem de fusidik asit yüklenen mikroemülsiyonlardan en yüksek *stratum corneum*, canlı *epidermis+dermis* tabakaları ve toplam deri penetrasyonuna sahip CLT (1:2) formülasyonu seçildi. Tek takrolimus yüklenen mikroemülsiyonlardan en yüksek toplam deri penetrasyonuna sahip OLT-CEL ile canlı *epidermis+dermis* tabakalarında en yüksek penetrasyona sahip OTT-PEG formülasyonları seçildi.

Model boya olarak lipofilik özelliği takrolimus ile benzer olan Nil Kırmızı kullanıldı (Pople ve Singh 2010; Lapteva ve ark. 2014). Şekil 4-31'de Nil Kırmızısı yüklü CLT (1:2), OLT-CEL ve OTT-PEG mikroemülsiyonları ile PBS süspansiyonunun uygulanmasının ardından domuz derilerinin xz ekseninde alınan kesitlerine ait CLSM görüntüleri gösterilmiştir. Bu çalışmayla Nil Kırmızısı yüklü mikroemülsiyonların daha yüksek bir dağılıma sahip olduğu ve deride en yüksek takrolimus lokalizasyonu sağlayan OTT-PEG mikroemülsiyonunun kıl kökü çevresinde de birikim oluşturduğu görüldü (Şekil 4-31, E).

Takrolimus ve fusidik asit yüklü optimizasyonu yapılan CLT (1:1) CLT (2:1) ve CLT (1:2) kodlu mikroemülsiyonların *in vitro* deriden penetrasyon çalışma bulguları dikkate alınarak CLT (1:2) formülasyonunun stabilitesi takip edildi. Stabilite çalışması, 2-8°C sıcaklık, 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem, 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nem, 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nem koşullarında 6 ay süre ile yürütüldü. Kimyasal stabilitesinin değerlendirilmesi kapsamında formülasyon içindeki etkin maddelerin miktarını saptamak için miktar tayini çalışmaları, formülasyondaki safsızlıkları belirlemek için safsızlık çalışmaları yapıldı.

Mikroemülsiyondaki başlangıç noktasına ait etkin madde geri kazanımları; takrolimus için %97,5 ve fusidik asit için % 102,5 olarak bulundu (Tablo 4-82). Takrolimus geri kazanım yüzdeleri 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşulunda % 92,1 - %97,3 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %90,4-%97,0 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %89,0-%94,6 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %66,0-%89,5 aralığında bulundu (Tablo 4-83). Bu verilere göre, etkin maddenin formülasyon içinde daha zorlayıcı sıcaklık ve nem koşullarından etkilenebileceği sonucuna varıldı.

Fusidik asit geri kazanım yüzdeleri 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşulunda %99,5-%101,5 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %98,5-%101,5 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %99,0-%100,0 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %98,0-%100,0 aralığında bulundu (Tablo 4-84). Bu verilere göre fusidik asitin formülasyon içinde daha kararlı olduğu sonucuna varıldı.

CLT (1:2) formülasyonunun başlangıç toplam safsızlık değeri % 1,3 olarak bulundu. 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşulunda toplam safsızlık %0,86-%1,5 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %1,3-%2,5 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %2,0-%3,5 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %3,3-%9,3 aralığında bulundu (Tablo 4-85). Bulgulara göre artan sıcaklık ve nem değerlerinin toplam safsızlık yüzdelerini artırdığı görüldü.

CLT (1:2) mikroemülsiyonunun fiziksel stabilitesinin değerlendirilmesi için pH, iletkenlik, viskozite, PS, PDI, RI ve zeta potansiyeli ölçümleri de yapıldı. Formülasyonun başlangıç viskozitesi 18,39 cP olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan viskozite ölçümlerinin 12,36-21,45 cP aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-86). Başlangıç

iletkenlik ölçüm değeri 19,52 µS/cm olan formülasyonun stabilite süresince iletkenlik değerleri 18,98 -23,9 µS/cm aralığında bulundu (Tablo 4-87). Formülasyonun başlangıç pH değeri 4,34 olarak stabilite pH değerleri 4,17- 4,49 aralığında kaydedildi (Tablo 4-88). Mikroemülsiyonun başlangıç damlacık büyüklüğü 4,67 nm ve stabilite noktalarındaki ölçümlerde damlacık boyutu 4,27-6,09 nm aralığında (Tablo 4-89) ve ayrıca başlangıç PDI değeri 0,093 olarak, stabilite noktalarındaki PDI değerleri 0,086-0,226 aralığında (Tablo 4-90) bulundu. Mikroemülsiyonuın başlangıç zeta potansiyeli -0,10 mV bulundu ve stabilite noktalarındaki zeta potansiyeli sıfır bölgesinde kaydedildi (Tablo 4-91). Mikroemülsiyonun başlangıç refraktif indeks değeri 1,404 olarak, stabilite noktalarındaki RI değerleri 1,404-1,406 olarak bulundu (Tablo 4-92). Fiziksel ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde CLT (1:2) mikroemülsiyounun termodinamik açıdan stabil olduğu görüldü.

Takrolimus içeren dört mikroemülsiyon formülasyonunun (OLT-CEL OLT, OTT-PEG ve OTT) stabiliteleri 2-8°C sıcaklık ile 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem koşullarında 3 ay süre ile takip edildi. Kimyasal stabilitenin değerlendirilmesinde formülasyon içindeki etkin madde miktarını saptamak için miktar tayini çalışmaları yapıldı.

OLT-CEL, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyonların başlangıç geri kazanım yüzdeleri sırasıyla %106,81±0,12, %100,75±1,07 ve %100,42±0,67 bulundu (Tablo 4-93). Mikroemülsiyonların 2-8°C sıcaklık ile 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem koşullarında 1. 2. ve 3. ay stabilite noktalarındaki geri kazanımları başlangıç değeriyle istatiksel açıdan karşılaştırıldığında değişim anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Dolayısıyla etkin maddenin formülasyonlar içinde stabil olduğuna karar verildi (Tablo 4-94).

OLT formülasyonunun takrolimus için 2-8°C sıcaklık koşulunda 1. ve 2. ay geri kazanımları ile 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem koşulunda 1. ve 3. ay geri kazanımları başlangıç değeriyle karşılaştırıldığında; değişimler istatiksel açıdan anlamlı ($p<0,05$) bulundu. Formülasyonun başlangıç geri kazanım yüzdesi %101,55 olarak (Tablo 4-93) ve takrolimus stabilite noktalarındaki geri kazanım yüzdeleri %103,03-%104,58 aralığında (Tablo 4-94) saptanmıştır. Geri kazanım değişmelerinin öngörülen limitleri içinde olduğundan (%90-%110) etkin maddenin formülasyon içinde stabil olduğuna karar verildi.

OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT kodlu mikroemülsiyonların fiziksel stabilitesinin değerlendirilmesi için pH, iletkenlik, viskozite, PS, PDI, RI ve zeta potansiyeli ölçümleri hem başlangıç zamanında (Tablo 4-93) hem de stabilite sonrası yapıldı.

OLT-CEL formülasyonunun başlangıç viskozitesi 33,64 cP olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan viskozite ölçümlerinin 32,93-42,11 cP aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-95). Başlangıç iletkenlik ölçüm değeri 37,02 µS/cm olan formülasyonun stabilite süresince iletkenlik değerleri 36,66-53,13 µS/cm aralığında bulundu (Tablo 4-96). Formülasyonun başlangıç pH değeri 4,41 olarak stabilite pH değerleri 4,24- 4,39 aralığında kaydedildi (Tablo 4-97). Mikroemülsiyonun başlangıç damlacık büyüklüğü 6,82 nm ve stabilite noktalarındaki ölçümlerde damlacık boyutu 6,81-7,02 nm aralığında (Tablo 4-98) ve ayrıca başlangıç PDI değeri 0,219 olarak, stabilite noktalarındaki PDI değerleri 0,210-0,247 aralığında (Tablo 4-99) bulundu. Mikroemülsiyonuın başlangıç zeta potansiyeli 0,130 mV bulundu ve stabilite noktalarındaki zeta potansiyeli sıfır bölgesinde daha çok negatif değerlerde kaydedildi (Tablo 4-100). Mikroemülsiyonun başlangıç refraktif indeks değeri 1,405 olarak stabilite noktalarındaki değerleri 1,404-1,405 aralığında bulundu (Tablo 4-101).

OLT formülasyonunun başlangıç viskozitesi 28,33 cP olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan viskozite ölçümlerinin 24,64-33,98 cP aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-95). Başlangıç iletkenlik ölçüm değeri 17,30 µS/cm olan formülasyonun stabilite süresince iletkenlik değerleri 17,52-27,99 µS/cm aralığında bulundu (Tablo 4-96). Formülasyonun başlangıç pH değeri 4,42 olarak stabilite pH değerleri 4,31-4,48 aralığında kaydedildi (Tablo 4-97). Mikroemülsiyonun başlangıç damlacık büyüklüğü 4,18 nm ve stabilite noktalarındaki ölçümlerde damlacık boyutu 4,00-4,99 nm aralığında (Tablo 4-98) ve ayrıca başlangıç PDI değeri 0,180 olarak stabilite noktalarındaki PDI değerleri 0,146-0,247 aralığında (Tablo 4-99) bulundu. Mikroemülsiyonun başlangıç zeta potansiyeli 0,033 mV bulundu ve stabilite noktalarındaki zeta potansiyeli sıfır bölgesinde daha çok pozitif değerlerde kaydedildi (Tablo 4-100). Mikroemülsiyonun başlangıç refraktif indeks değeri 1,415 olarak stabilite noktalarındaki değerleri 1,415-1,416 aralığında bulundu (Tablo 4-101).

OTT-PEG formülayonunun başlangıç viskozitesi 44,55 cP olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan viskozite ölçümlerinin 45,75 -55,67 cP aralığında değiştiği

kaydedildi (Tablo 4-95). Başlangıç iletkenlik ölçüm değeri 49,17 µS/cm olan formülasyonun stabilite süresince iletkenlik değerleri 51,07-56,94 µS/cm aralığında bulundu (Tablo 4-96). Formülasyonun başlangıç pH değeri 4,92 olarak stabilite pH değerleri 4,96-5,08 aralığında kaydedildi (Tablo 4-97). Mikroemülsiyonun başlangıç damlacık büyüklüğü 7,92 nm ve stabilite noktalarındaki ölçümlerde damlacık boyutu 7,79- 8,95 nm aralığında (Tablo 4-98) ve ayrıca başlangıç PDI değeri 0,248 olarak stabilite noktalarındaki PDI değerleri 0,237-0,252 aralığında (Tablo 4-99) bulundu. Mikroemülsiyonuın başlangıç zeta potansiyeli - 0,069 mV bulundu ve stabilite noktalarındaki zeta potansiyeli sıfır bölgesinde daha çok pozitif değerlerde kaydedildi (Tablo 4-100). Mikroemülsiyonun başlangıç refraktif indeks değeri 1,410 olarak stabilite noktalarındaki değerleri 1,407-1,409 aralığında bulundu (Tablo 4-101).

OTT formülasyonunun başlangıç viskozitesi 55,62 cP olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan viskozite ölçümlerinin 53,24-58,01 cP aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-95). Başlangıç iletkenlik ölçüm değeri 44,87 µS/cm olan formülasyonun stabilite süresince iletkenlik değerleri 44,36-48,00 µS/cm aralığında bulundu (Tablo 4-96). Formülasyonun başlangıç pH değeri 5,21 olarak stabilite pH değerleri 5,25-5,35 aralığında kaydedildi (Tablo 4-97). Mikroemülsiyonun başlangıç damlacık büyüklüğü 4,07 nm ve stabilite noktalarındaki ölçümlerde damlacık boyutu 3,58-10,19 nm aralığında (Tablo 4-98) ve ayrıca başlangıç PDI değeri 0,530 olarak stabilite noktalarındaki PDI değerleri 0,257-0,545 aralığında (Tablo 4-99) bulundu. Mikroemülsiyonuın başlangıç zeta potansiyeli 0,038 mV bulundu ve stabilite noktalarındaki zeta potansiyeli sıfır bölgesinde tüm değerler negatif olarak kaydedildi (Tablo 4-100). Mikroemülsiyonun başlangıç refraktif indeks değeri 1,418 olarak stabilite noktalarındaki değerleri 1,417-1,418 aralığında bulundu (Tablo 4-101).

Fiziksel ölçüm sonuçları değerlendirildiğinde; OLT-CEL, OLT, OTT-PEG ve OTT mikroemülsiyonlarının termodinamik açıdan stabil olduğuna karar verildi.

Tez çalışması kapsamında *in vivo* çalışmalar için iki etkin maddenin birlikte yüklendiği, *in vitro* koşullarda en yüksek *stratum corneum*, canlı *epidermis+dermis* tabakaları ve toplam deri penetrasyonuna sahip ve ayrıca stabilitesi takip edilen CLT (1:2) mikroemülsiyonu seçildi. Mikroemülsiyon bileşiminde yer alan yardımcı maddelerin deri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için mikroemülsiyon, etkin maddeler yüklenmeden hazırlandı. 10 sağlıklı gönüllünün ön kol bölgesinde seçilen alanda formülasyon

uygulanmadan önce ve uygulandıktan 1 saat sonrası olmak üzere uygulama öncesi ile uygulama sonrası şeklinde biyofiziksel ölçümler (deri hidratasyonu, deri pH ve renginin ölçümü, transepidermal su kaybı ölçümü) (Galzote ve ark. 2008 p.467) ile deri lipitlerinin yapısal düzeninin değerlendirilmesi amacıyla ATR-FTIR analizleri (Schwarz ve ark. 2012) yapıldı. Uygulama öncesi alınan ölçüm sonuçları her gönüllü için kontrol değeri olarak kullanıldı.

Korneometer ölçümleriyle derinin hidrasyon seviyesi değerlendirildi. Tüm gönüllülerde uygulama sonrasında hidrasyonun arttığı saptandı ($p<0,05$). pH ölçümlerinde bazı gönüllerde artma bazılarında azalma olduğu görüldü ve değişimler istatiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Mexameter ölçümleriyle elde edilen eritem ve melanin değerlerinde de bazı gönüllerde artma bazılarında azalma olduğu görüldü. Melanin ve eritem değişimler istatiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). TEWL ölçümlerinin ise tüm gönüllülerde arttığı kaydedildi ($p<0,05$). Bu artışın, mikroemülsiyon uygulaması sonrası artan deri hidrasyonuna bağlı olduğu düşünüldü (Tablo 4-102 ve Tablo 4-103 ile Şekil 4-32-Şekil 4-36 aralığı).

In vivo ATR-FTIR ölçümlerinde asimetrik gerilme bantlarında değişimler istatiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Simetrik gerilme bantlarında ise artış olduğu saptandı (Gönüllü 9 hariç, uygulama öncesi ve uygulama sonrası 2854,14 cm^{-1} ve 2852,45 cm^{-1} aralığında). Söz konusu değişimler istatiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlı bulundu ($p<0,05$) (Tablo 4-104 ile Şekil 4-37 ve Şekil 4-38). Simerik gerilme bantları, deri lipitlerinin alkil zincirlerinde meydana gelen düzensizliğe daha hassastır ve bu bantın daha yüksek dalga numaralarında saptanması, alkil zincirlerin hareketliliğinin arttığına işaret eder. *In vivo* çalışma sonucunda elde edilen bu bulgu, *in vitro* penetrasyon çalışmasının sonunda gerçekleştirilen ATR-FTIR analizinin sonucu ile uyumlu bulunmuştur.

Optimizasyon çalışması tamamlanan takrolimus ve fusidik asit yüklü merhemlerin (MR-TC-9 ve MR-PC-6) fiziksel kontrolleri yapıldıktan sonra (Tablo 4-105) kimyasal stabiliteleri 2-8°C sıcaklık, 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nem, 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nem, 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nem koşullarında 6 ay süre ile izlendi. Kimyasal stabilitenin değerlendirilmesi için etkin madde miktar tayini çalışmaları ve safsızlık çalışmaları yapıldı.

MR-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun başlangıç noktasına ait etkin madde geri kazanımları takrolimus için % 98,3 ve fusidik asit için % 100,3 olarak bulundu (Tablo 4-106). Takrolimus geri kazanım yüzdeleri 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşullunda %94,5-%98,1 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %92,9-%97,1 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %84,7-%95,8 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %66,1-%91,4 aralığında bulundu (Tablo 4-107). Bu verilere göre takrolimusun formülasyon içinde daha zorlayıcı sıcaklık ve nem koşullarından etkilenebileceği sonucuna varıldı.

Fusidik asit geri kazanım yüzdeleri 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşullunda %97,5-%100 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %98,0-%101,5 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %96,0-%101,0 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %87,5-%97,0 aralığında bulundu (Tablo 4-108). Bu verilere göre formülasyon içinde fusidik asidin de daha zorlayıcı sıcaklık ve nem koşullarından etkilenebileceği ancak takrolimusa göre daha stabil olduğu sonucuna varıldı.

Formülasyonunun başlangıç toplam safsızlık değeri % 1,1 olarak bulundu. 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşulunda toplam safsızlık %1,2-% 1,6 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %1,2 -%1,9 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %1,4-%2,3 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %1,8-%3,9 aralığında bulundu (Tablo 4-109). Bulgulara göre artan sıcaklık ve nem değerlerinin toplam safsızlık yüzdelerini artırdığı görüldü.

MR-TC-9 kodlu merhem formülasyonunun fiziksel stabilitesinin değerlendirilmesi için pH ve viskozite ölçümleri yapıldı. Başlangıç viskozitesi 28072,14 cP olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan viskozite ölçümlerinin 26704-37238 cP aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-110). Başlangıç pH değeri 5,74 olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan pH ölçümlerinin 5,70-6,60 aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-111).

MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun başlangıç noktasına ait etkin madde geri kazanımları takrolimus için %99,8 ve fusidik asit için %101,5 olarak bulundu (Tablo 4-106). Takrolimus geri kazanım yüzdeleri 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşullunda %99,4-%100,6 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %99,1-%100,3 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %98,1-%98,9

aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %91,4-%97,4 aralığında bulundu (Tablo 4-112). Bu verilere göre, takrolimusun formülasyon içinde daha zorlayıcı sıcaklık ve nem koşullarından etkilenebileceği sonucuna varıldı.

Fusidik asit geri kazanım yüzdeleri 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşullunda %102,5-%103,0 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %102,0-% 103,0 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %102,0-%103,0 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %102,5-%106,5 aralığında bulundu (Tablo 4-113). Bu verilere göre, fusidik asidin formülasyon içinde stabil olduğu sonucuna varıldı.

Formülasyonunun başlangıç toplam safsızlık değeri % 1,4 olarak bulundu. 1. 2. 3. ve 6. ay stabilite noktaları için 2-8°C sıcaklık koşulunda toplam safsızlık %0,6-%1,3 aralığında; 25°C±2 sıcaklık ve %60±5 bağıl nemde %0,6-%1,5 aralığında; 30°C±2 sıcaklık ve %65±5 bağıl nemde %0,56-%1,6 aralığında; 40°C±2 sıcaklık ve %75±5 bağıl nemde %1,3-%2,8 aralığında bulundu (Tablo 4-114). Bulgulara göre artan sıcaklık ve nem değerlerinin toplam safsızlık yüzdelerini artırdığı görüldü.

MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonunun fiziksel stabilitesinin değerlendirilmesi için pH ve viskozite ölçümleri yapıldı. Başlangıç viskozitesi 23058 cP olarak bulundu ve stabilite noktalarında yapılan viskozite ölçümlerinin 17096-26226 cP aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-115). Başlangıç pH değeri olarak 6,20 bulundu ve stabilite noktalarında yapılan pH ölçümlerinin 6,10-6,48 aralığında değiştiği kaydedildi (Tablo 4-116).

Merhem formülasyonlarından elde edilen çıktılara dayanarak; etkin maddelerin geri kazanımlarının daha yüksek ve toplam safsızlıklarının daha düşük olduğu, çözücü olarak Propilen karbonat kullanılan takrolimus ve fusidik asit yüklü MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonu etkin maddelerin piyasa preparatları ile karşılaştırmalı olarak *in vitro* salım ve *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları için seçildi.

MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonundan etkin maddelerin serbestleşme hızları sentetik membranlar kullanılarak *in vitro* koşullarda değerlendirildi. Etkin maddelerin birbirlerinin salım hızını etkileyip etkilemediğini araştırmak için (El Maghraby ve ark. 2014) sadece takrolimus yüklü merhem ve sadece fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarının da *in vitro* salım çalışmaları yapıldı.

Takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Protopic® merhem ve sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonlarından takrolimusun *in vitro* salım bulguları (Tablo 4-117) Fick'in Birinci Yasası'na (Şekil 4-39) ve Higuchi kinetik modeline (Şekil 4-40) göre istatiksel açıdan değerlendirildiğinde, MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonu ile sadece Takrolimus yüklü merhem formülasyonu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Hem MR-PC-6 formülasyonundan hem de sadece Takrolimus içeren merhem formülasyonundan takrolimus salımı, pazarda mevcut Protopic® merhemden anlamlı derecede yüksek bulundu ($p <0,05$). Bu durum Protopic® merhemin daha yüksek viskozite değerine sahip olması ile açıklanabilir.

Takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem (MR-PC-6), Fucidin® merhem ve sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonlarından fusidik asidin *in vitro* salım bulguları (Tablo 4-118) Fick'in Birinci Yasası'na (Şekil 4-41) ve Higuchi kinetik modeline (Şekil 4-42) göre istatiksel açıdan değerlendirildiğinde; MR-PC-6 kodlu merhem formülasyonu ile sadece Fusidik asit yüklü merhem formülasyonu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p >0,05$). Fusidik asidin hem MR-PC-6 formülasyonundan hem de sadece Fusidik asit içeren merhem formülasyonundan salımı ise pazarda mevcut olan Fucidin® merhemden anlamlı derecede yüksek bulundu ($p <0.05$). Benzer şekilde bu durum da Fucidin® merhemin (30905,9 cp) MR-PC-6 formülasyonuna (23058 cP) göre daha yüksek viskozite değerine sahip olması ile açıklanabilir. Tarek ve ark. hazırladıkları topikal formülasyonlarda polimer konsantrasyonunu arttıkça; Özsoy ve ark. ise emülsiyon bazlı topikal merhem formülasyonlarında vazelin miktarı arttıkça viskozitenin arttığını ve buna bağlı olarak ilaç salım hızının azaldığını göstermişlerdir (Özsoy ve ark. 2004; Tarek ve ark. 2011).

Takrolimus ve fusidik asit yüklü merhem formülasyonunun (MR-PC-6) ve piyasa preparatlarının (Protopic® merhem ve Fucidin® merhem) 12 saat *in vitro* deriden penetrasyon çalışmaları yapılarak derinin tabakalarında biriken etkin maddelerin miktarları saptandı. MR-PC-6 merhem formülasyonundan *stratum corneum*'a penetre olan takrolimusun miktarı Protopic® merheme göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$). MR-PC-6 merhem formülasyonundan serbestleşen ve *stratum corneum*'a penetre olan takrolimus miktarının daha yüksek olması; bu formülasyonunun Protopic® merhemden daha düşük viskozite değerine sahip olması ve dolayısı ile difüzyon hızının artması ile açıklanabilir. MR-PC-6 ve Protopic® merhemleri, canlı *epidermis+dermis*

tabakalarına penetre olan takrolimus miktarları açısından karşılaştırıldığında ise aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). Bu durum; her iki merhem preparatının takrolimusu derinin derin tabakalarına ulaştırma potansiyellerinin benzer olduğunu göstermektedir (Tablo 4-119 ve Şekil 4-43).

MR-PC-6 merhem formülasyonundan ve Fucidin® merhemden fusidik asidin *stratum corneum*'a ve canlı *epidermis+dermis* tabakalarına penetre olan fusidik asit miktarlarının ise benzer olduğu görüldü ($p>0,05$) (Tablo 4-119 ve Şekil 4-44).

MR-PC-6 merhem formülasyonunun ve etkin maddelerin piyasa preparatlarının deri üzerindeki etkilerinin değerlendirmesi için yapılan ATR-FTIR analizlerinde gerilme bantlarında herhangi bir artış tespit edilmedi (Tablo 4-121).

Sonuç olarak bu tez kapsamında yürütülen çalışmalar ile; tek takrolimus ve takrolimus ile fusidik asiti birlikte içeren, AD tedavisine yönelik yenilikçi nano boyutlu koloidal ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Optimize edilen mikroemülsiyon tipi bu formülasyonların fiziksel ve kimyasal açıdan kararlılığı kanıtlanmıştır. Geliştirilen nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistem ile özellikle takrolimusun derinin hedef tabakalarındaki dağılımının ve lokalizasyonunun iyileştirildiği gösterilerek, AD tedavisi için alternatif teşkil edebilecek yenilikçi bir ürün geliştirilmiştir. Ayrıca, bu tez projesinde; ilk defa takrolimus ile fusidik asiti bir arada içeren merhem formülasyonu da geliştirilmiş ve pazara sunulmak üzere alternatif yeni bir ürün olarak önerilmiştir.

KAYNAKLAR

Acartürk, F. (2007). Reaksiyon Kinetiği ve Stabilite. İçinde Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, *Modern Farmasötik Teknoloji.* Ankara: Fersa Matbaacılık Ltd. Şti.; 141-182.

Aggarwal, N., Goindi, S. ve Khurana, R. (2013). Formulation, characterization and evaluation of an optimized microemulsion formulation of griseofulvin for topical application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **105,*** 158– 166.

Akdiş, C.A., Akdiş. M., Bieber, T., Bindslev-Jensen, C., Boguniewicz, M., Eigenmann, P. ve ark. (2006). Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, **118**,*152-169.

Alper, S. ve Türk Gerçeker, B. (2011). Atopik Dermatit. *Türkderm, **45,*** 168-173.

Alvarez-Figueroa, M. J. ve Blanco-Méndez, J. (2001). Transdermal delivery of methotrexate: Iontophoretic delivery from hydrogels and passive delivery from microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics, **215,*** 57–65.

Anılmert B. (2014). GHB, Ketamin, Norketamin, Fenobarbital, Tiyopental, Zolpidem, Zopiklon ve Fenitoin'in LC-MS/MS Yöntemi İle İdrardan Eşzamanli Tayini. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Adli Tip Enstitüsü, p. 63, 99-115.

Anton, N. ve Vandamme, T.F. (2011). Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharmacy research, **28,*** 978–985.

Araya, H., Tomita, M. ve Hayashi, M. (2005). The novel formulation design of O/W microemulsion for improving the gastrointestinal absorption of poorly water soluble compounds. *International Journal of Pharmaceutics**, 305,*** 61-74.

Assmann, T., Homey, B. ve Ruzicka, T. (2000). Applications of tacrolimus for the treatment of skin disorders. *Immunopharmacology, **47,*** 203-213.

Attwood, D. (1994). Microemulsions. İçinde Kreuter, J. (Ed.), Colloidal Drug Delivery Systems. Dekker, New York, pp. 31–71.

Attwood, D. (2002) Disperse Sysytems. İçinde Aulton, M.E. (Ed). Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design Edinburgh ; New York, Churchill Livingstone, pp.70-100.

Bagwe, R.P., Kanicky, J.R., Palla, B.J., Patanjali. P.K. ve Shah, D.O. (2001). Improved drug delivery using microemulsions: rationale, recent progress, and new horizons. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems,* ***18,*** 77-140.

Barker, J.N., Palmer, C.N., Zhao, Y., Liao, H., Hull, .P. R., Lee, S.P. ve ark. (2007). Null mutations in the filaggrin gene (FLG) determine major susceptibility to early-onset atopic dermatitis that persists into adulthood. *Journal of Investigative Dermatology*, ***127***, 564-567.

Baroli, B., López-Quintela, M.A., Delgado-Charro, M.B., Fadda, A.M. ve Blanco-Méndez, J. (2000). *Journal of Controlled Release,* ***69,*** 209 –218.

Barot, B.S., Parejiya, P.B., Patel, H.K., Gohel, M.C. ve Shelat, P.K. (2012). Microemulsion-Based Gel of Terbinafine for the Treatment of Onychomycosis: Optimization of Formulation Using D-Optimal Design. *American Association of Pharmaceutical Scientists,* ***13,*** 184-192.

Beica, T., Moldovan, R.,Tintaru, M., Enache, I., Frunza,S., (2004) Measurements of optical anisotropy of a calamitic lyotropic liquid crystal. *Crystal Research Technology*, ***39,*** 151–156.

Bekersky, I., Fitzsimmons, W., Tanase, A., Maher, R.M., Hodosh, E. ve Lawrence, I. (2001). Nonclinical and early clinical development of tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, ***44***, 17-27.

Beltrani, V.S. ve Boguneiwicz, M. (2003). Atopic dermatitis. *Dermatology Online Journal* , ***9***,1.

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

Bhargava, H.N., Narurkar, A. ve Lieb, L.M. (1987). Using microemulsions for drug delivery, *Pharmaceutical Technology,* ***11***, 46– 52

Bieber T. (2007). The pro- and anti-inflammatory properties of human antigen-presenting cells expressing the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI). *Immunobiology* ***212***, 499-503.

Bieber, T. (2010). Atopic dermatitis. *Annals of Dermatology,* ***22,*** 125-137.

Bieber, T., Cork, M., Ellis, C., Girolomoni, G., Groves, R. Langley R. ve ark. (2005). Consensus statement on the safety profile of topical calcineurin inhibitors. *Dermatology*, ***211***, 77-78.

Biruss, B. ve Valenta, C. (2008). The advantage of polymer addition to a non-ionic oil in water microemulsion for the dermal delivery of progesterone. *International Journal of Pharmaceutics,* ***349,*** 269–273

Black, D., Del Pozo, A., Lagarde. J.M. ve Gall, Y. (2000). Seasonal variability in the biophysical properties of stratum corneum from different anatomical sites. *Skin Research and Technology*, ***6,*** 70-76

Bommannan, D., PottsR.O. ve Guy, R.H. (1990). Examination of stratum corneum barrier function in vivo by infrared spectroscopy, *Journal of Investigative Dermatology*, ***95,*** 403-408.

Boonme, P., Boonthongchuay, C., Wongpoowarak, W. ve Amnuaikit, T. (2016). Evaluation of nicotinamide microemulsion on the skin penetration enhancement. *Pharmaceutical Development and Technology*, ***21,*** 116-120.

Bouwstra, J.A. (2011). The skin barrier function, İçinde Stratum corneum model membranes: molecular organization in relation to skin barrier function. P.9

Bouwstra, J.A. ve Gooris, G.S. (2010). The Lipid Organisation in Human Stratum Corneum and Model Systems. *The Open Dermatology Journal*, ***4***, 10-13.

Breternitz, M., Flach, M., Prässler, J., Elsner, P. ve Fluhr, J.W. (2007). Acute barrier disruption by adhesive tapes is influences by pressure, time and anatomical location: integrity and cohesion assessed by sequential tape stripping. *British Journal of Dermatology*, ***156,*** 231–240.

Brown, M.B., Martin, G.P., Jones, S.A. ve Akomeah, F.K. (2006). Dermal and transdermal drug delivery systems: current and future prospects. *Drug Delivery*, ***13***, 175-187.

Brown, M.C., Turner, R. ve Lim, S.T. (2012). Topical Product Formulation Development. İçinde Benson H.A.E. ve Watkinson A.C. (Eds.), *Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice*, New jersey: John Wiley and Sons; 255-286.

Burducea, G., (2004) Lyotropic Liquid Crystals I. Specific Structures. *Romanian Reports in Physics*, ***56,*** 66-86.

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

Çapan, Y. (2002). Kontrollü salım sistemlerinin salım mekanizmaları ve kullanılış yolları. İçinde A.Z. Gürsoy (Ed.), *Kontrollü Salım Sistemleri*. İstanbul: Elma Bilgisayar Basım ve Ambalaj San. Tic. Ltd. Şti. ;41-64.

Cather, J.C., Abramovits, W. ve Menter, A. (2001). Cyclosporine and tacrolimus in dermatology. *Dermatologic Clinics, **19,*** 119-137.

Çelebi, N. (2007). Koloidler. İçinde Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, Modern Farmasötik Teknoloji. Ankara: Fersa Matbaacılık Ltd. Şti.; 263-274.

Changez, M., Varshney, M., Chander, J. ve Dinda, A.K. (2006). Effect of the composition of lecithin/n-propanol/ isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: In vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, **50,*** 18–25.

Charman, C. Ve Williams H. (2003). The use of corticosteroids and corticosteroid phobia in atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*, ***21***, 193-200.

Chen, H., Chang, X., Du, D., Li, J., Xu, H. ve Yang, X. (2006). Microemulsion-based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics, **315,*** 52–58.

Chen, H., Chang, X., Weng, T., Zhao, X., Gao, Z. ve Yang, Y. (2004). A study of microemulsion systems for transdermal delivery of triptolide. *Journal of Controlled Release, **98,*** 427–436

Chen, H., Mendelsohn, R., Rerek, M.E. ve Moore, D.J. (2000). Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry studies of fatty acid homogeneous ceramide 2. *Biochimica et Biophysica Acta*, ***1468***, 293-303.

Chen, H., Mou, D., Du, D., Chang, X., Zhu, D., Liu, J. ve ark (2007). Hydrogel-thickened microemulsion for topical administration of drug molecule at an extremely low concentration. *International Journal of Pharmaceutics **34,*** 78-84.

Choa, C. W. ve Shin, S. C. (2012). Enhanced Controlled Transdermal Delivery of Mexazolam Using Ethylene-vinyl Acetate. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, ***11***, 3–12.

Colin Long, C. (2007). Common skin disorders and their topical treatment, İçinde Walters KA., (Ed), *Dermatological and Transdermal Formulations*. New York: Marcel Dekker, pp 41–60.

Constantinides, P.P. ve Scalart, J.P. (1997). Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. *International Journal of Pharmaceutics, **158,*** 57-68

Cork, M.J., Danby, S.G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M.E., Moustafa M. ve ark. (2009). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology, **129,*** 1892–1908.

Cullander, C. (1997).The laser-scanning confocal microscope. İçinde Wilhelm K-P., Elsner P., Berardesca E., Maibach HI. (Eds.) Bioengineering of the Skin: Skin Surface and Analysis. CRC Press, Boca Raton; pp. 23-37.

Danino, D., Bernheim-Groswasser,.A. ve Talmon, Y. (2001). Digital cryogenic transmission electron microscopy: an advanced tool for direct imaging of complex fluids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **183–185***, 113–122.

Darsow, U., Wollenberg, A., Simon, D., Taïeb, A., Werfel, T., Oranje, A. ve ark. (2010). European Task Force on Atopic Dermatitis/EADV Eczema Task Force. ETFAD / EADV eczema task force 2009 position paper on diagnosis and treatment of atopic dermatitis. ***24***, 317-328.

Değim, T. (2007). Deriden emilim ve deriye uygulanan yarı katı preparatlar. İçinde Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, *Modern Farmasötik Teknoloji.* Ankara: Fersa Matbaacılık Ltd. Şti.; 337-364.

Desai, P., Patlolla, R.R. ve Singh, M. (2010). Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. *Molecular Membrane Biology, **27,*** 247-259

Djekic, L. ve Primorac, M. (2008). The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. *International Journal of Pharmaceutics, **352,*** 231–239.

Djekic, L., Primorac, M., Filipic, S. ve Agbaba, D. (2012). Investigation of surfactant/cosurfactant synergism impact on ibuprofen solubilization capacity and drug release characteristics of nonionic microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics, **433***, 25-33.

Djordjevic, L., Primorac, M., Stupar, M. ve Krajisnik, D. (2004). Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*, ***271,***11–19.

Eales, L.J. (2003). *Immunology for life scientists* (2nd), UK, Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, p. 1-28.

Eberlein, B., Eicke C, Reinhardt, H.W. ve Ring, J. (2008). Adjuvant treatment of atopic eczema: assessment of an emollient containing N-palmitoylethanolamine (Atopa study). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, ***22,*** 73–82.

El Maghraby G.M., Arafa, M.F. ve Osman, M.A. (2014). Microemulsion for simultaneous transdermal delivery of benzocaine and indomethacin: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, ***40***,1637-1644.

El-Hadidy, G.N., İbrahim, H.K., Mohamed, M.I. ve El-Milligi, M.F. (2012). Microemulsions as vehicles for topical administration of voriconazole: formulation and in vitro evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy, **38,*** 64–72.

Elias, P.M. ve Schmuth, M. (2009). Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, ***9,*** 437–446.

Elias, P.M. ve Steinhoff, M. (2008). "Outside-to-Inside" (and Now Back to "Outside") Pathogenic Mechanisms in Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology, **128***, 1067–1070.

Elidel® (Pimecrolimus) krem 1 % (2001). Amerika Birleşik Devletleri Reçete Bilgileri. East Hanover (NJ), Novartis Pharmaceuticals Corporation.

Elidel® (Pimecrolimus) krem 1 % (2010). Amerika Birleşik Devletleri Reçete Bilgileri. East Hanover (NJ), Novartis Pharmaceuticals Corporation.

Erdal, M.S., Özdin, D. ve Güngör, S. (2014). Synergistic effects of transcutol and terpenes as penetration enhancers: in vitro and in vivo ATR-FTIR spectroscopic imaging studies. İçinde Brain, K.R. ve Chilcott, R.P. (Eds.), A*dvances in dermatological sciences.* Cambridge: Royal Society of Chemistry, pp 113–123.

Erdal, M.S., Özhan, G., Mat, M.C., Özsoy, Y. ve 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,*** 565-570.

Escribano, E., Calpena, A,C,, Queralt, J,, Obach, R. ve Domenech, J. (2003). Assessment of diclofenac permeation with different formulations: Anti-inflammatory study of a selected formula. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, ***19,*** 203–210.

European Pharmacopoeia 8.0 (2012). Fusidik asit.

Fanun M. (2012). Microemulsions as delivery systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, ***17,*** 306–313.

Fardet, L., Kassar, A., Cabane, J. ve Flahault, A. (2007). Corticosteroid-induced adverse events in adults: frequency, screening and prevention. *Drug Safety* ***30,*** 861-881.

FDA (Şubat 2005). Food and Drug Administration Pediatric Advisory Committee, Briefing information. Erişim tarihi 07.12.2016. Erişim internet adresi: http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/ briefing/2005-4089b2.htm.

Foldvari, M., Badea, I., Wettig, S., Baboolal, D., Kumar, P., Creagh, A.L. ve ark. (2010). Topical Delivery of Interferon Alpha by Biphasic Vesicles: Evidence for a Novel Nanopathway across the Stratum Corneum. *Molecular Pharmaceutics*, ***7***, 751-762.

Fouad, S.A., Basalious, E.B., El-Nabarawi M.A. ve Tayel, S.A. (2013). Microemulsion and poloxamer microemulsion-based gel for sustained transdermal delivery of diclofenac epolamine using in-skin drug depot: in vitro/in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, ***453***, 569– 578.

Fusidic Acid – DrugBank, Erişim tarihi (23.11.2016), Erişim internet adresi:https://www.drugbank.ca/drugs/DB02703.

Fusidik acid (2011). *İlaç Ana Dosyası, (Drug Master File).* Kullanıcıya Açık Bölüm Ercros, S.A., İspanya.

Galzote, C, Suero, M. ve Govindarajan, R. (2008). Noninvasive Evaluation of Skin in the Cosmetic Industry. İçinde Walter A.K. ve Roberts, M.S. (Eds). *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development Therapeutic and Novel Approaches*, New York:Informa Healthcare, pp. 467-485.

Gay, C.L., Guy, R.H., Golden, G.M., Mak, V.H. ve Francoeur, M.L. (1994). Characterization of low-temperature (i.e. < 65 degrees C) lipid transitions in human stratum corneum. *The Journal of Investigative Dermatolology*, ***103***, 233-239.

Ge, S., Lin, Y., Lu, H., Li, Q., He, J., Chen, B. ve ark. (2014). Percutaneous delivery of econazole using microemulsion as vehicle: formulation, evaluation and vesicle-skin interaction. *International Journal of Pharmacy, **465**,* 120-31.

Geçgil Ş. (1991). Farmasötik Teknolojiye Başlangıç. İstanbul: Cihan Matbaacılık Ltd. Şti.; 281-294.

Ginger, R.S., Blachford, S.,Rowland, J., Rowson, M. ve Harding, C.R. (2005). Filaggrin repeat number polymorphism is associated with a dry skin phenotype. *Archives of Dermatological Research, **297,*** 235-241.

Goebel, A.S.B., Knie, U. Abels, C., Wohlrab, J. ve Neubert, R.H.H. (2010). Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **75,*** 162–172.

Goebel, A.S.B., Neubert, R.H.H. ve Wohlrab, J. (2011). Dermal targeting tacrolimus colloidal carrier systems. *International Journal of Pharmacy, **404**,* 159-168.

Goshi, K.O., Iguchi, M. ve Tagami, H. (2000). Functional analysis of the stratum corneum of scalp skin: studies in patients with alopecia areata and androgenetic alopecia, *Archives of Dermatological Research, **292,*** 605–611.

Greene, R.S., Downing, D.T., Pochi, P.E. ve Strauss, J.S. (1970). Anatomical variation in the amount and composition of human skin surface lipid. *Journal of Investigative Dermatology, **57**,* 240-247.

Grimalt, R., Mengeaud, V., Cambazard, F. ve Çalışma Grubu (2007). Study Investigators' Group. The steroid-sparing effect of an emollient therapy in infants with atopic dermatitis: a randomized controlled study. *Dermatology, **214**,* 61-67.

Guinedi, A.S., Mortada, N.D., Mansour, S. ve Hathout, R.M. (2005). Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics, **306**,* 71-82.

Güneş, H. ve Çetin E.S. (2012). Toplumdan Kazanılmış Metisiline Dirençli S. aureus. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, **3**,* 83-90.

Güngör, S., Erdal, M.S. ve Özdin, D. (2011). Derinin Yapısının Aydınlatılması ve Geçirgenliğin Değerlendirilmesinde Kullanılan Biyofiziksel Yöntemler. *Türkiye Klinikleri Dermatoloji Dergisi, **1**,* 25-39.

Güngör, S. (2014) Topikal Uygulanan Nanotaşıyıcılar. İçinde Gürsoy A.Z. (Ed.), *Nanofarmasötikler ve Uygulamaları.* İstanbul: Aktif Matbab ve Reklam Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti. ; 333-342.

Güngör, S. ve Bergişadi, N. (2004). Effect of penetration enhancers on in vitro percutaneous penetration of nimesulide through rat skin. *Pharmazie, **59***, 39-41.

Gupta, A.K., Adamiak, A. ve Chow, M. (2002).Tacrolimus: a review of its use for the management of dermatoses. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereolog **16,*** 100-114.

Gupta, R.R., Jain, S.K. ve Varshney, M. (2005). AOT water-in- oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5- fluorouracil. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, ***41,*** 25–32.

Gürbüz, A., Özhan, G., Güngör, S. ve 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.

Gutfreund, K., Bienias, W., Szewczyk, A. ve Kaszuba, A. (2013). Topical calcineurin inhibitors in dermatology. Part I: Properties, method and effectiveness of drug use. *Postępy Dermatologii Alergologii/Advances in Dermatology and Allergology Supplement*, ***30,*** 165–169.

Haagerup, A., Bjerke, T., Schiotz, P.O., Dahl, R., Binderup, H.G., Tan, Q. ve ark. (2004). Atopic dermatitis: a total genome scan for susceptibility genes. *Acta Dermato-Venereologica, **84***, 346-352.

Hadgraft, J. ve Guy, R. H. (2003). Feasibility assessment in topical and transdermal delivery: mathematical models and in vitro studies. İçinde Guy, R.H. ve Hadgraft, J. (Eds.), *Transdermal Drug Delivery*, (2nd ed.), New York: Marcel Dekker, pp. 1-23.

Hanifin, J.M. ve Tofte, S.J. (1999). Update on therapy for atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, **3***, 123-125.

Harding, C.R., Watkinson A, Rawlings AV. (2000). Dry skin moisturisation and corneodesmolysis. *International Journal of Cosmetic Science **22,*** 21-52.

Hatfield, R.M. ve Fung, L.W. (1995). Molecular properties of a stratum corneum model lipid system: large unilamellar vesicles. *Biophysical Journal, **68,*** 196-207.

Hathout, R. M, Mansour, S, Geneidi, A. S, ve Mortada, N. D. (2011).Visualization, dermatopharmacokinetic analysis and monitoring the conformational effects of a microemulsion formulation in the skin stratum corneum. *Journal of Colloid and Interface Science, **354,*** 124-130.

Hathout, R.M. ve Elshafeey, A.H. (2012). Development and characterization of colloidal soft nano-carriers for transdermal delivery and bioavailability enhancement of an

angiotensin II receptor blocker. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* ***82,*** 230-240.

Hathout, R.M. ve Nasr, M. (2013). Transdermal delivery of betahistine hydrochloride using microemulsions: physical characterization, biophysical assessment, confocal imaging and permeation studies. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **110**, 254-60.

Hathout, R.M., Mansour, S., Mortada, N.D., Geneidi, A.S. ve Guy, R.H. (2010). Uptake of microemulsion components into the stratum corneum and their molecular effects on skin barrier function. *Molecular Pharmaceutics,* **7**, 1266–1273.

Hathout, R.M., Woodmanb, T.J., Mansoura, S., Mortadaa, N.D., Geneidia, A.S. ve Guy R.H. (2010). Microemulsion formulations for the transdermal delivery of testosterone. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, **40***,188–196.

Heisenberg, W. (1995). Surfactants. İçinde Buckton, G. (Ed.), *Interfacial Phenomena in Drug Delivery and targeting*, Harwood Academic Publishers, Switzerland, 135-161.

Hellweg, T. (2002). Phase structures of microemulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science, **7**,* 55-56.

Herkenne, C., Alberti, I., Naik, A., Kalia, Y.N., Mathy, F., Preat, V. ve ark. (2008). In Vivo Methods for the Assessment of Topical Drug Bioavailability. *Pharmaceutical Research, **25**,* 87-103.

Heuschkel S., Goebel A. ve Neubert R.H. (2008) . Microemulsions modern colloidal carrier for dermal and transdermal drug delivery. *Journal Pharmaceutical Science, **97**,* 603-631.

Heuschkel, S., Wohlrab, J. ve , Neubert, R.H. (2009). Dermal and transdermal targeting of dihydroavenanthramide D using enhancer molecules and novel microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **72,*** 552–560.

Higuchi, T. (1963). Mechanism of Sustained- Action Medication Theoretical Analysis of Rate of Release of Solid Drugs Dispersed in Solid Matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences, **52,*** 1145-1149.

Hoar, J.P. ve Schulman, J.H. (1943). Transparent water-in-oil dispersions: the oleopathic hydromicelle. *Nature, **152,*** 102–103.

Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T. ve Leung, D.Y. (2006). Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, **118,*** 178-189.

Hon, K.L., Wong, K.Y., Leung, T.F., Chow, C.M. ve Ng, P.C. (2008). Comparison of skin hydration evaluation sites and correlations among skin hydration, transepidermal water loss, SCORAD index, Nottingham Eczema Severity Score, and quality of life in patients with atopic dermatitis. *The American Journal of Clinical Dermatology*, ***9,*** 45-50.

Hosmer, J., Reed, R., Bentley, M.V., Nornoo, A. ve Lopes, L.B. (2009). Microemulsions containing medium-chain glycerides as transdermal delivery systems for hydrophilic and hydrophobic drugs. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, ***10,*** 589–596.

Huang, Y.B.; Lin, Y.H.; Lu, T.M.; Wang, R.J.; Tsai, Y.H.; Wu, P.C. (2008). Transdermal delivery of capsaicin derivative-sodium nonivamide acetate using microemulsions as vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, ***349,*** 206–211.

ICH Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: Text and Methology Q' (R1) 2005.

Jadoul, A., Hanchard, C., Thysman, S. ve Préat, V. (1995). Quantification and localization of fentanyl and TRH delivered by iontophoresis in the skin. *International Journal of Pharmaceutics*, ***120***, 221-228.

Jahn, W. ve Strey, R. (1988). Microstructure of Microemulsions by Freeze Fracture Electron Microscopy. *Journal of Physical Chemistry*, ***92***, 2294-2301.

Janssens, M., van Smeden, J., Gooris, G.S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P.J. ve ark. (2011). Lamellar Lipid Organization and Ceramide Composition in the Stratum Corneum of Patients with Atopic Eczema. *Journal of Investigative Dermatology*, ***131,*** 2136-2138.

Jensen, J.M., Pfeiffer, S., Witt, M., Bräutigam, M., Neumann, C., Weichenthal, M. ve ark. (2009). Different effects of pimecrolimus and betamethasone on the skin barrier in patients with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, ***123,*** 1124-1133.

Jensen-Michael, J., Proksch, E. ve Elias, P.M. (2006). The stratum corneum of the epidermis in atopic dermatitis. İçinde Elias, P.M. ve Feingold, K.R. (Eds.), *Skin Barrier*. New York: Taylor and Francis; 569-581.

Joshi, M., Butola, B.S., Saha K. (2014). Advances in topical drug delivery system: micro to nanofibrous structures. *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*, ***14***, 853-867.

Kalaitzaki, A., Poulopoulou, M., Xenakis, A. Papadimitriou V. (2014). Surfactant-rich biocompatible microemulsions as effective carriers of methylxanthine drugs *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, ***442,*** 80-87.

Kamitani, Y., Yagi, M. Nomoto, K., Hori, M., Naito, J. ve Yonei, Y. (2013). Non-invasive collection of stratum corneum samples by a tape-stripping technique. *Anti-Aging Medicine, **10**,* 55-59.

Kato, A., Fukai, K,, Oiso, N., Hosomi, N., Murakami, T. ve Ishii, M. (2003). Association of SPINK5 gene polymorphisms with atopic dermatitis in the Japanese population. *British Journal of Dermatology, **148**,* 665-669.

Kawashima, M., Nakagawa, H., Ohtsuki, M., Tamaki, K. ve Ishibashi, Y. (1996). Tacrolimus concentrations in blood during topical treatment of atopic dermatitis. *The Lancet, **348,*** 1240-1241.

Kitagawa, S., Tanaka, Y., Tanaka, M., Endo, K. ve Yoshii, A. (2009). Enhanced skin delivery of quercetin by microemulsion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, **61,*** 855-560.

Kitson, N. (2008). Drugs Used for Skin Diseases İçinde Walter A.K. ve Roberts, M.S. (Eds.). *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development Therapeutic and Novel Approaches,* New York:Informa Healthcare, pp.11-20.

Kocabeyoğlu, Ö., Diler, M., Emekdaş, G., Erdemoğlu, A. ve Kutlu H. (1999). Türkiye'de yeni kullanıma giren stafilokok suşlarına etkinliğinin mikrodilüsyon ile araştırılması. *Ankem, **13**,* 48-52.

Kogan, A. ve Garti, N. (2006). Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloid and Interface Science, **123-126**,* 369-385.

Korting, H.C. ve Schäfer-Korting, M. (2010). Carriers in the topical treatment of skin disease. *Handbook of Experimental Pharmacology, **197**,* 435-468.

Krakowski, A.C, Eichenfield L.F. ve Dohil, M.A. (2008). Management of atopic dermatitis in the pediatric population. *Pediatrics,**122**,* 812-824.

Kreilgaard M. (2002). Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews**, 54,*** 77–98.

Kreilgaard, M., Pedersen, E.J. ve Jaroszewski, J.W. (2000). NMR 217ractice217ization and transdermal drug delivery potential of microemulsion systems. *Journal of Controlled Release, **69,*** 421– 433.

Krutmann, J. (2000). Phototherapy for atopic dermatitis. *Clinical and Experimental Dermatology, **25***, 552-558.

Ktistis, G. (1997). Effect of polysorbate 80 and sorbitol concentration on in vıtro release of indomethacin from microemulsions. *Journal of Dispersion Science and Technology,**18,*** 49-61.

Kumar K.S., Dhachinamoorthi, D., Saravanan, R., Gopal, U.K. ve Shanmugam, V. (2011) Microemulsions As Carrier For Novel Drug Delivery: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research,**10,*** 37-45.

Kutlubay, Z., Küçüktaş, M., Engin, B. ve Serdaroğlu S. (2012). Atopik Dermatit Tedavisi. *Dermatoz; **3,*** 62-68.

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***, 317–323.

Lapteva, M., Mondon, K., Möller, M., Gurny, R. 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***, 2989−3001.

Laugel, C., Rafidison, P., Potard, G., Aguadisch, L. ve Baillet, A. (2000). Modulated release of triterpenic compounds from a O/W/O multiple emulsion formulated with dimethicones: infrared spectrophotometric and differential calorimetric approaches. *Journal of Controlled Release, **63,*** 7-17.

Lawrencea, M.J. ve Rees, G.D. (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews **45***, 89–121.

Lawson, E.E.1, Anigbogu, A.N., Williams, A.C., Barry, B.W. ve Edwards, H.G.(1998). Thermally induced molecular disorder in human stratum corneum lipids compared with a model phospholipid system; FT-Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, **54A,*** 543-558.

Lee, S.G., Kang, J.B., Kim, S.R., Kim, C.J., Yeom, D.W. ve Yoon, H.Y. (2016). Enhanced topical delivery of tacrolimus by a carbomer hydrogel formulation with transcutol P. *Drug Development and Industrial Pharmacy, **42,*** 1636-1642.

Legat, F.J. ve Wolf, P. (2009). Cutaneous sensory nerves: mediators of phototherapeutic effects? *Frontiers in Bioscience* (Landmark Ed). ***14,*** 4921-3141

Lehmann, L., Keipert, S. ve Gloor, M. (2001). Effects of microemulsions on the stratum corneum and hydrocortisone penetration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **52**,*129-36.

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,*** 336-345.

Leite-Silva, R.V., de Almeida, M. M., Fradin, A., Grice, J.E., Roberts, M.S. (2012). Delivery of drugs applied topically to the skin. *Expert Review of Dermatology, **7,*** 383–397.

Leung, D.Y.M. (2000). Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology,**105,*** 860-876.

Leung, D.Y.M., Boguniewicz, M., Howell, M.D., Nomura, I. ve Hamid, Q.A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation, **113,*** 651-657.

Li, G., Fan, Y., Fan, C., Li, X., Wang, X. ve Li, M. (2012). Tacrolimus-loaded ethosomes: physicochemical characterization and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **82**,* 49–57.

Lindemann, U,, Wilken, K., Weigmann, H.J., Schaefer, H., Sterry, W. ve Lademann, J. (2003). Quantification of the horny layer using tape stripping and microscopic techniques. *Journal of Biomedical Optics **8,*** 601-607.

Liu, H., Li, S., Wang, Y., Han, F. ve Dong, Y. (2006). Bicontinuous water-AOT/Tween85-isopropyl myristate microemulsion: A new vehicle for transdermal delivery of 219ractice219iza A. *Drug Development and Industrial Pharmacy **32,*** 549–557.

Loden M. (2001). Skin barrier function: Effects of moisturizers. *Cosmetics Toiletries, **116,*** 31–40.

Löffler, H., Dreher, F., Maibach, H.I. (2004). Stratum corneum adhesive tape stripping: influence of anatomical site, application pressure, duration and removal. *British Journal of Dermatology, **151**,* 746-752.

Long, B.H. (2008). Fusidic acid in skin and soft-tissue infections Acta Dermato-Venereologica, Suppl ***216,*** 14-20.

Lopes, L.B. (2014). Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions. *Pharmaceutics, **6**,* 52-77.

Lugovic, L., Lipozenocic, J. ve Jakic-Razumovic, J. (2001). Atopic dermatitis: immunophenotyping of inflammatory cells in skin lesions. *International Journal of Dermatology, **40**,* 489-494.

Madsen, H. B., Ifversen, P., Madsen, F., Brodin, B., Hausser, I. ve Nielsen, H. M. (2009). In vitro Cutaneous Application of ISCOMs on Human Skin Enhances Delivery of Hydrophobic Model Compounds Through the Stratum Corneum. *American Association of Pharmaceutical Scientists, **11,*** 728-739.

Marenholz, I., Nickel, R., Rüschendorf, F., Schulz, F., Esparza-Gordillo, J., Kerscher, T. ve ark. (2006). Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, **118**,* 866-871.

Marttin, E., Neelissen-Subnel, M.T., De Haan, F.H. ve Boddé, H.E. (1996). A critical comparison of methods to quantify stratum corneum removed by tape stripping. *Skin Pharmacology. **9**,* 69-77.

Masukawa, Y., Narita, H., Shimizu, E., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T. ve ark. (2008). Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *The Journal of Lipid Research, **49**,* 1466-1476.

Matsumoto, Y., Hamashima, H., Masuda. K., Shiojima. K., Sasatsu. M. ve Arai, T. (1998). The antibacterial activity of plaunotol against Staphylococcus aureus isolated from the skin of patients with atopic dermatitis. *Microbios. **96,*** 149–155.

Michaels, A.S. Chandrasekaran, S.K. ve Shaw J.E. (1975). Drug permeation through human skin: Theory and invitro experimental measurement. *AI Ch E Journal, **21,*** 985-996.

Moghimipour, E., Salimi, A. ve Eftekhari, S. (2013). Design and Characterization of Microemulsion Systems for Naproxen. *Advanced Pharmaceutical Bulletin, **3**,* 63-71.

Montenegro, L., Carbone, C. ve Puglisi, G. (2011). Vehicle effects on in vitro release and skin permeation of octylmethoxycinnamate from microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics, **405,*** 162–168

Morar, N., Cookson, W.O., Harper, J.I. ve Moffatt, M.F. (2007). Filaggrin mutations in childrenwith severe atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology **127**,*1667-1672.

Moreno Gimenez, J. C. (2000) Atopic dermatitis. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology, **15**,* 279-295.

Moulik, S.P. ve Paul, B.K. (1998). Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science, **78,*** 99-195.

Mura, P., Faucci, M.T., Bramanti, G. ve Corti, P. (2000). Evaluation of transcutol as a clonazepam transdermal permeation enhancer from hydrophilic gel formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, **9***, 365–372.

Muzaffar, Singh, U. K. ve Chauhan, L. (2013). Review on Microemulsion as Futuristic Drug Delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, **5***, 39-53.

Naik, A. ve Guy, R.H. (1997). Infrared spectroscopic and differential scanning calorimetric investigations of the stratum corneum barrier function. İçinde Potts, R.O. ve Guy, R.H. (Eds.) *Mechanisms of Transdermal Drug Delivery.* New York: Marcel Dekker, pp 87–162.

Naik, A., Pechtold, A.R.M.L., Potts, R.O. ve Guy, R.H. (1995). Mechanism of oleic acid-induced skin penetration enhancement in vivo in humans. *Journal of Controlled Release, **37,*** 299-306.

Neubert, R.H.H. (2011). Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, **77,*** 1–2.

Ng, K.W. ve. Lau, W.M. (2015). Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. İçinde Dragicevic, N. ve Maibach, H.I. (Eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement.* Springer Berlin Heidelberg New York Dordrecht London; p. 9.

Ngawhirunpat ,T., Worachun, N., Opanasopit,.P. Rojanarata,.T. ve Panomsuk, S. (2013). Cremophor RH40-PEG 400 microemulsions as transdermal drug delivery carrier for ketoprofen. *Pharmaceutical Development and Technology, **18***, 798-803.

Nghiem, P., Pearson, G. Ve Langley, R.G. (2002). Tacrolimus and pimecrolimus: from clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis *Journal of the American Academy of Dermatology, **46,*** 228-241.

Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M. ve Ganz, T. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *New England Journal of Medicine, **347***, 1151-1160.

Özsoy, Y., Güngör, S. ve Cevher, E. (2004). Vehicle effects on in vitro release of tiaprofenic acid from different topical formulations. *II Farmaco, **59,*** 563-566.

Paolino, D., Ventura, C.A., Nisticò, S., Puglisi, G. ve Fresta, M. (2002). Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics,* ***244***, 21–31.

Park, J., Lee, J., Kim, Y. ve Prausnitz, M. R. (2008). The effect of heat on skin permeability. *International Journal of Pharmaceutics,* ***359***, 94-103.

Patel, H.K., Barot, B.S., Parejiya, P.B., Shelat, P.K. ve Shukla, A. (2013). Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: ex vivo permeation and skin irritation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,* ***102,*** 86– 94.

Patravale, V.B. ve Date., A.A. (2009). Microemulsions: Pharmaceutical Applications. İçinde Stubenrauch C. (Ed.), *Microemulsions: Background, New Concepts, Applications, Perspectives.* UK: John Wiley and Sons; 259-301.

Peltola, S., Saarinen-Savolainen, P., Kiesvaara, J., Suhonen, T.M. ve Urtti, A. (2003). Microemulsions for topical delivery of estradiol. *International Journal of Pharmaceutics,* ***254***, 99–107.

Pirot, F., Kalia, Y.N., Stinchcomb, A.L. Keating, G., Bunge, A. ve Guy, R.H. (1997). Characterization of the permeability barrier of human skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* ***94***, 1562–1567.

Plötz, S.G. ve Ring J. (2010). What's new in atopic eczema? *Expert Opinion Emerging Drugs,* ***15***, 249-267.

Podlogar, F., Bester Rogac, M. ve Gasperlin, M. (2005). The effect of internal structure of selected water-Tween 40-Imwitor 308-IPM microemulsions on ketoprofene release. *International Journal of Pharmaceutics,* ***302,*** 68–77.

Podlogar, F., Gasperlin, M., Tomsic, M., Jamnik, A. ve Rogac, M.B. (2004). Structural 222ractice222ization of water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *International Journal of Pharmaceutics,* ***276,*** 115–128.

Ponec, M., Weerheim, A., Lankhorst, P. ve Wertz, P.(2003). New acylceramide in native and reconstructed epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, ***120***, 581-588.

Pople, P.V. ve Singh, K.K. (2010). Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatment of atopic dermatitis. *International Journal of Pharmaceutics* ***398,*** 165–178.

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,*** 82–94.

Pople, P.V. ve Singh, K.K. (2012). Targeting tacrolimus to deeper layers of skin with improved safety for treatmentof atopic dermatitis—Part II: In vivo assessment of dermatopharmacokinetics, biodistribution and efficacy. *International Journal of Pharmaceutics,* ***434***,70-79.

Pople, P.V. ve Singh, K.K. (2013). Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus, Part II – In vivo assessment, drug targeting, efficacy, and safety in treatment for atopic dermatitis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* ***84,*** 72–83.

Prasch, T. ve Förster, T. (2002). Detection of Cosmetic Changes in Skin Surface Lipids by Infrared and Raman Spectroscopy. İçinde Förster, T. (Ed.), *Cosmetic Lipids and the Skin Barrier*, New York: Marcel Dekker Inc. pp. 227-254.

Proksch, E., Jensen, J.M. ve Elias, P.M. (2003). Skin lipids and epidermal differentiation in atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology,* ***21****,* 134-144.

Protopic® (Tacrolimus) merhem 0.03 % ve merhem 0.1 % (2000). Amerika Birleşik Devletleri Reçete Bilgileri, Deerfield (IL): Fujisawa Healthcare, Inc.

Protopic® (Tacrolimus) merhem 0.03 % ve merhem 0.1 % (2011). Amerika Birleşik Devletleri Reçete Bilgileri, Deerfield (IL): Astellas Pharma US, Inc.

Pygall, S. R., Whetstone, J., Timmins, P., ve Melia, C. D. (2007). Pharmaceutical applications of confocal laser scanning microscopy: The physical 223ractice223ization of pharmaceutical systems. *Advanced Drug Delivery Reviews,* ***59****,* 1434-1452.

Rawlings, A.V. (2003). Trends in stratum corneum research and the management of dry skin conditions. *International Journal of Cosmetic Science,* ***25,*** 63-95.

Refraktometri. Ref. e_makaleleri, Enstrümantal Analiz, Erişim tarihi (14.10.2016), Erişim internet adresi: www.bayar.edu.tr/besergil/13_refraktometri.pdf.

Ren, Q., Deng, C., Meng, L., Chen, Y., Chen. L ve Sha, X. (2014). In vitro, ex vivo, and in vivo evaluation of the effect of saturated fat acid chain length on the transdermal behavior of ibuprofen-loaded microemulsions. *Pharmaceutics, Drug Delivery and Pharmaceutical Technology,* ***103,*** 1680–1691.

Rigopoulos D. ve Larios, G. (2008) Fusidic acid: a valuable agent for controlling Staphylococcus aureus skin infections. *Acta Dermato-Venereologica,* Suppl ***216,*** 7–13.

Ring, J., Abraham, A., de Cuyper, C., Kim, K., Langeland, T. ve Parra, V. (2008). Control of atopic eczema with pimecrolimus cream 1 % in pediatric patients with mild to moderate disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, **22**, 718-721.

Ring, J., Alomar, A., Bieber, T., Deleuran, M., Fink-Wagner, A., Gelmetti, C. Ve ark. (2012). Guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) part I. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, **26,*** 1045–1060.

Roberts, M.S., Cross, S. E. ve Pellett, A. M. (2007) Skin Transport. İçinde Walters, K.A. (Eds.). Dermatological and Transdermal Formulations New York, Basel: Marcel Dekker Inc. pp. 89-195

Rossetti, F.C., Depieri, L.V. ve Bentley, M.R.L.P. (2013). Confocal Laser Scanning Microscopy as a Tool for the Investigation of Skin Drug Delivery Systems and Diagnosis of Skin Disorders. İçinde Confocal Laser Microscopy – Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences. InTech, Rijeka, Croatia; pp.99-140.

Rougier, A., Dupuis, D., Lotte, C., Roguet, R. ve Schaefer, H. (1983). In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption *Journal of Investigative Dermatology, **81**,* 275 – 278.

Rowe, R.C., Sheskey, P. J. ve Quinn, M. E. (2009). Alpha Tocopherol. *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* pp. 31-33.

Rowe, R.C., Sheskey, P. J. ve Quinn, M. E. (2009). Benzoic acid. *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* pp. 61-63.

Rowe, R.C., Sheskey, P. J. ve Quinn, M. E. (2009). Butylated Hydroxytoluene. *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* pp. 75-76.

Rowe, R.C., Sheskey, P. J. ve Quinn, M. E. (2009). Butylated Hydroxyanisole. *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* pp. 73-74,

Rowe, R.C., Sheskey, P. J. ve Quinn, M. E. (2009). Disodium Edetate. *Handbook of Pharmaceutical Excipients,* pp. 242-244.

Ruzicka, T., Assmann, T. ve Homey, B. (1999). Tacrolimus: the drug for the turn of the millennium? *Archives of Dermatology, **135,*** 574-80.

RX Media Pharma (2017). Fusidik asit/sodium fusidat etkin maddelerini içeren krem ve merhem müstahzarları. Erişim tarihi (29.01.2017). Erişim adresi: mobile@rxmediapharma.com (1,91).

RX Media Pharma (2017). Takrolimus etkin maddesinin kullanıldığı merhem müstahzarları. Erişim tarihi (29.01.2017). Erişim adresi: mobile@rxmediapharma.com (1,91).

Sabale, V. ve Vora, S. (2016). Formulation and evaluation of microemulsion-based hydrogel for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutical Investigation, **2,*** 140-149.

Saeki, H., Furue ,M,. Furukawa, F., Hide, M., Ohtsuki, M., Katayama, I. ve ark. (2009). Guidelines for management of atopic dermatitis. *Journal of Dermatology, **36**,* 563-577.

Sahle, F.F. Metz, H. Wohlrab, J. ve Neubert, R. H. H. (2013). Lecithin-Based Microemulsions for Targeted Delivery of Ceramide AP into the Stratum Corneum: Formulation, Characterizations, and In Vitro Release and Penetration Studies. *Pharmacy research, **30**,* 538–551.

Sahle, F.F., Metz, H., Wohlrab. J. ve Neubert. R.H. (2012). Polyglycerol fatty acid ester surfactant-based microemulsions for targeted delivery of ceramide AP into the stratum corneum: formulation, 225ractice225ization, in vitro release and penetration investigation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **82**,* 139–150.

Sakurai, K., Sugiura, H., Matsumoto, M. ve Uehara, M. (2002). Occurrence of patchy parakeratosis in normal-appearing skin in patients with active atopic dermatitis and in patients with healed atopic dermatitis: a cause of impaired barrier function of the atopic skin. *Journal of Dermatological* Science, ***30**,* 37-42.

Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D. ve McLean, W.H. (2009) Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science, **122,*** 1285-1294.

Santos, P., Watkinson, A.C., Hadgraft, J. ve Lane, M.E. (2008) .Application of Microemulsions in Dermal and Transdermal Drug Delivery. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, **21,*** 246-259.

Schröder J. M. ve Harder J. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences, **63,*** 469–486.

Schulman, J.H., Stoeckenius, W. ve Prince, L.M. (1959). Mechanism of formation and structure of microemulsions by electron microscopy. *Journal of Physical Chemistry* ***63,*** 1677–1680.

Schwarz, J.C., Klang, V., Hoppel, M., Mahrhauser, D. ve Valenta, C. (2012). Natural microemulsions: formulation design and skin interaction. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,* ***81,*** 557–562

Schwarz, J.C., Pagitsch, E. ve Valenta, C. (2013). Comparison of ATR-FTIR spectra of porcine vaginal and buccal mucosa with ear skin and penetration analysis of drug and vehicle components into pig ear. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, ***50,*** 595–600.

Schwindt, D.A., Wilhelm, K.P. ve Maibach, H.I. (1998). Water diffusion characteristics of human stratum corneum at different anatomical sites in vivo. *Journal of Investigative Dermatolog*, ***111***, 385-389.

Shah, P.V. ve Williams, R. L. (2014). Methods for the Assessment of Bioequivalence of Topical Dosage Forms: Correlations, Optimization Strategies, and Innovative Approaches. İçinde Shah V.S., Maibach, H.I. ve Jenner, J. (Eds.), *Topical Drug Bioavailability, Bioequivalence and Penetration* New York: Springer Sicience Business Media; pp.61-80.

Shen, L.N., Zhang, Y.T., Wang, Q., Xu, L. ve Feng, N.P. (2014). Preparation and evaluation of microemulsion-based transdermal delivery of total flavone of 226ractic arisaematis. *International Journal of Nanomedicine*, ***9***, 3453-3464.

Shreffler, W.G., Castro. R.R., Küçük. Z.Y., Charlop-Powers, Z., Grishina, G. ve Yoo, S. (2006). The major glycoprotein allergen from arachis hypogaea, Ara h 1, is a ligand of dendritic cell-specific ICAM-grabbing nonintegrin and acts as a Th2 adjuvant in vitro. *Journal of Immunology*, ***177,*** 3673685.

Shukla, A., Janich, M., Jahn, K. ve Neubert, R.H.(2003). Microemulsions for dermal drug delivery studied by dynamic light scattering: effect of interparticle interactions in oil-in-water microemulsions. *Journal of Pharmaceutical*, ***92,*** 730-738.

Shukla, A., Janich, M., Jahn, K., Krause, A., Kiselev, M.A. ve Neubert, R.H. (2002). Investigation of pharmaceutical oil/water microemulsions by small-angle scattering. *Pharmaceutical Research*, ***19,*** 881–886.

Shukla, A., Krause, A. ve Neubert R.H.N. (2003). Microemulsion as Colloidal Vehicle Systems for Dermal Drug Delivery. Part IV: Investigation of Microemulsion Systems

Based on a Eutectic Mixture of Lidocaine and Prilocaine As The Colloidal Phase By Dynamic Light Scattering. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, **55,*** 741-748.

Silva, J. A., Bedor, D. C. G., Damasceno, B. P. G. L., Oliveira, A. G. Egito, E. S. T. ve Santana, D. P. (2009). Physicochemical Characterization and Development of a Microemulsion System for Transdermal Use. *Journal of Dispersion Science and Technology, **31,*** 1-8.

Silva-Cunha, A., da Silva, G.R., de Castro, W.V. ve Fialho, S.L. (2014). Evaluation of the pharmacokinetics and ocular tolerance of a microemulsion containing tacrolimus. *Journal Of Ocular Pharmacology And Therapeutics, **30,*** 59-65.

Simpson E., Böhling A., Bielfeldt S., Bosc, C. ve Kerrouche, N. (2013). Improvement of skin barrier function in atopic dermatitis patients with a new moisturizer containing a ceramide precursor *Journal of Dermatological Treatment, **24,*** 122–125.

Simpson EL. (2010). Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Current Medical Research & Opinion, **26**,* 633–640.

Sinko P.J. (2006). *Martin's Physical Pharmacy Pharmaceutical Sciences*: *physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*. Fifth Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp.21-83.

Sintov, A.C. ve Shapiro L. (2004). New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. *Journal of Controlled Release **95***, 173– 183.

Smith, G., Kumar, P. ve Nguyen,D. (2004). Formulating Cleaning Products with Microemulsions. CD Proceedings 6th World Surfactant Congress CESIO, Berlin Germany. 164. Erişim Tarihi (19.09.2016), Erişim internet adresi: www.firp.ula.ve/archivos/.../04_CESIO_Smith_164.pd.

Söğüt-Ertaş, Ö. Ve Kayalı, A. (2005). Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış. Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi, 34(1),41-57.

Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal, **299***, 1259-1260.

Stuart, B. (2004). Biological Applications. İçinde Stuart B. (Ed.), *Infrared Spectroscopy:Fundamentals and Applications,* England: John Wiley & Sons; 138-165.

Sugawara, T., Kikuchi, K. Tagami, H., Aiba, S. ve Sakai, S.(2012). Decreased lactate and potassium levels in natural moisturizing factor from the stratum corneum of mild

atopic dermatitis patients are involved with the reduced hydration state. *Journal of Dermatological Science*, ***66***, 154-159.

Şenyiğit, T., Özcan, I. ve Özer, Ö. (2012). Innovative topical formulations for treatment of dermatitis. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, ***6,*** 186-201.

Şenyiğit, T., Sonvico, F., Barbieri, S., Özer, Ö, Santi, P. ve Colombo, P. (2010). Lecithin/chitosan nanoparticles of clobetasol-17-propionate capable of accumulation in pig skin. *Journal of Controlled Release*, ***142,*** 368–373.

Şenyiğit, T., Sonvico, F., Rossi, A., Tekmen, I., Santi, P., Colombo, P. ve ark. (2016). In Vivo Assessment of Clobetasol Propionate-Loaded Lecithin-Chitosan Nanoparticles for Skin Delivery. *International Journal of Molecular Sciences,**18***, 32.

Tacrolimus – DrugBank, Erişim tarihi (23.01.2017), Erişim internet adresi:https://www.drugbank.ca/drugs/DB00864.

Takka, S. Acartürk, F. Ağabeyoğlu, İ. Çelebi, N. Değimi T. ve Değim, Z. (2007). İçinde Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, *Modern Farmasötik Teknoloji*. Ankara: Fersa Matbaacılık Ltd. Şti.; 119-140.

Takrolimus (2014). *İlaç Ana Dosyası, (Drug Master File).* Kullanıcıya Açık Bölüm Concord Biotech Limited, Hindistan.

Tarek, A. A., Hany, M.I., Fathy I., Samy, A.M., Fetoh, E. ve Nutan, T. H. M. (2011). In vitro release, rheological, and stability studies of mefenamic acid coprecipitates in topical formulations. *Pharmaceutical Development and Technology*, ***16,*** 497–510.

Teeranachaideekul, V., Boonme, P., Souto, E. B, Müller, R. H, ve Junyaprasert, V. B. (2008). Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release*, ***128***, 134-141.

Teichmann, A., Heuschkel, S., Jacobi, U., Presse, G., Neubert, R.H. ve Sterry, W. (2007). Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, ***67,*** 699–706.

Thomson, A.W. (1990). FK506 enters the clinic. *Immunology Today*, ***11***, 35–36.

Tırnaksız, F. (2007). Difüzyon. İçinde Türk Eczacıları Birliği Eczacılık Akademisi Yayını, *Modern Farmasötik Teknoloji*. Ankara: Fersa Matbaacılık Ltd. Şti.; 113-118.

Touitou, E., Godin, B., Karl, Y., Bujanover, S. ve Becker Y. (2002). Oleic acid, a skin penetration enhancer, affects Langerhans cells and corneocytes. *Journal of Controlled Release* ,***80,*** 1-7.

Trommer, H. ve Neubert, R.H. (2006). Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration. A review. *Skin pharmacology and physiology, **19**,* 106-121.

Tsai, J.C., Weiner, N.D., Flynn, G.L. ve Ferry, J. (1991).Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping. *International Journal of Pharmaceutics, **72**,* 227-231.

Tuncay, S. ve Özer, Ö. (2013). Investigation of different emulsion systems for dermal delivery of nicotinamide. *Pharmaceutical Development and Technology, **18,*** 1417-1423.

United States Pharmacopeia 36 (2013). Takrolimus.

Valenta, C. ve Schultz, K. (2004). Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. *Journal of Controlled Release, **95,*** 257–265.

Van Bever, H.P.S. ve Llanora, G. (2011). Features of childhood atopic dermatitis. Asian Pac *Journal of Allergy and Clinical Immunology, **29**,*15-24.

Van Smeden J., Hoppel, L., van der Heijden, R. Hankemeier, T., Vreeken, R.J. ve Joke Bouwstra J.A. (2011). LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *The Journal of Lipid Research, **52**,* 1211–1221.

Vandamme, T.F. (2002). Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Progress in Retinal and Eye Research, **21,*** 15-34.

Vavrova, K., Zbytovska J., Palat, K., Holas, T., J Klimentova J., Hrabáalek, A. ve Dolezal, P. (2004). Ceramide analogue 14S24 ((S)-2-tetracosanoylamino-3-hydroxypropionic acid tetradecyl ester) is effective in skin barrier repair in vitro. (2004). *European Journal of Pharmaceutical Sciences, **21,*** 581-587.

Walling, H.W. ve Swick, B.L. (2010). Update on the management of chronic eczema: new approaches and emerging treatment options. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology, **3**,* 99–117.

Walters, K.A. ve Roberts, M.S. (2007) The Structure and Function of the Skin. İçinde Walters, K.A. (Eds.), *Dermatological and Transdermal Formulations* New York, Basel: Marcel Dekker Inc. pp.1-39.

Wan, T., Xu, T., Pan, J., Qin, M., Pan, W., Zhang, G. ve ark (2015). Microemulsion based gel for topical dermal delivery of pseudolaric acid: in vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics, **493,*** 111–120.

Weerheim, A. ve Ponec, M. (2001). Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Archives of Dermatological Research, **293,*** 191-199.

Weigmann, H., Lademann, J., Meffert, H., Schaefer, H. ve Sterry, W. (1999). Determination of the horny layer profile by tape stripping in combination with optical spectroscopy in the visible range as a prerequisite to quantify percutaneous absorption. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology, **12,*** 34-45

Wiedersbeg, S. ve Nicoli, S. (2012). Skin Permeation Assessment: Tape Stripping. İçinde Benson H.A.E. ve Watkinson A.C. (Eds.), *Transdermal and Topical Drug Delivery Principles and Practice,* New jersey: John Wiley and Sons; 109-130.

Williams A.C. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery: From theory to clinical practice.* London: Pharmaceutical Press, 1-25.

Williams A.C. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery: From theory to clinical practice*. London: Pharmaceutical Press, 26-49.

Williams A.C. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery: From theory to clinical practice.* London: Pharmaceutical Press, pp.51-82.

Williams A.C. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery: From theory to clinical practice*. London: Pharmaceutical Press, pp.83-122.

Williams A.C. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery: From theory to clinical practice.* London: Pharmaceutical Press, 168-194.

Winsor, P.A. (1948). Hydrotropy, solubilisation and related emulsification processes. *Transactions of the Faraday Society*, ***44,*** 376–398.

Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M. ve, Sato Y. (1991). Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research, **283**,* 219–223.

Yuan, Y., Li, S.M., Mo, F.K. ve Zhong, D.F. (2006). Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam. *International Journal of Pharmaceutics **321,*** 117–123.

Yun, I.S., Lee, W.J., Rah, D.K., Kim, Y.O. ve Park, B.Y. (2010). Skin color analysis using a spectrophotometer in Asians. *Skin Research and Technology*, ***16***, 311–315.

Zhang, J. ve Michniak-Kohn, B. (2011). Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine, and caffeine. *International Journal of Pharmaceutics*, ***421***, 34-44 .

Zhao, L., Wang, Y., Zhai, Y., Wang, Z., Liu, J. ve Zhai, G. (2014). Ropivacaine loaded microemulsion and microemulsion-based gel for transdermal delivery: preparation, optimization, and evaluation. *International Journal of Pharmaceutics,* ***477,*** 47–56.

Zhao, X., Liu, J.P., Zhang, X. ve Li, Y. (2006). Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. *International Journal of Pharmaceutics,* ***327,*** 58–64.

Zhu, W., Yu, A., Wang, W., Dong, R., Wu, J. ve Zhai, G. (2008). Formulation design of microemulsion for dermal delivery of penciclovir. *International Journal of Pharmaceutics,* ***360***, 184-190.

Zutavern, A., Hirsch, T., Leupold, W., Weiland, S., Keil, U. ve Mutius, E. (2005). Atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis and the hygiene hypothesis: results from a cross-sectional study. *Clinical & Experimental Allergy,* ***35***,1301-1308.

HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı : 1314 **Tarih : 18.08.2015**

Konu : Doç. Dr. Sevgi GÜNGÖR

Sayın Doç. Dr. Sevgi GÜNGÖR
Eczacılık Fakültesi

İlgi :Eczacılık Fakültesinin 08/06/2015 gün ve 181 sayılı yazısı

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Ecz. Sinem GÜNGÖRDÜK' ün yürüteceği 2015/1259 dosya numaralı "Atopik Dermatit Tedavisine Yönelik Yenilikçi Topikal Formülasyonların Geliştirilmesi, İn Vitro ve İn Vivo Koşullarda Değerlendirilmesi" başlıklı çalışma kurulumuzun 14/08/2015 tarih ve 13 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**
	AÇIK ADRESİ:	**İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL**
	TELEFON	**0 (212) 414 21 53**
	FAKS	**0 (212) 414 21 53**
	E-POSTA	**itfetikkurul@istanbul.edu.tr.**

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Atopik Dermatit Tedavisine Yönelik Yenilikçi Topikal Formülasyonların Geliştirilmesi, İn Vitro ve İn Vivo Koşullarda Değerlendirilmesi"**			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	**Doç. Dr. Sevgi GÜNGÖR**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	**Farmasötik Teknoloji**			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	**İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı**			
	DESTEKLEYİCİ	---			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZI	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ■	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ■	ULUSLAR ARASI ☐

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	**"Atopik Dermatit Tedavisine Yönelik Yenilikçi Topikal Formülasyonların Geliştirilmesi, İn Vitro ve İn Vivo Koşullarda Değerlendirilmesi"**

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	18/06/2015		Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	■		Türkçe ■ İngilizce ☐ Diğer☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer☐

	Belge Adı	☐	Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐	
	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	■	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	■	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgu Rapor Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:13**	**Tarih: 14/08/2015**
	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalında görevli **Doç. Dr. Sevgi GÜNGÖR' in** sorumluluğunda ve Ecz. Sinem GÜNGÖRDÜK' ün yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU	
ÇALIŞMA ESASI	**19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik**
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki *		Katılım **		İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	**Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji**	**İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı**	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ☐	H ■	İZİNLİ
Prof. Dr. Berrin UMMAN	**Kardiyoloji**	**İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)**	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	**Romatoloji**	**İstanbul Tıp Fakültesi**	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ☐	H ■	KATILMADI
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	**Nöroloji**	**İstanbul Tıp Fakültesi**	E ■	K ☐	E ☐	H ■	E ■	H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	**Biyoistatistik**	**İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik**	E ☐	K ■	E ☐	H ■	E ■	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

PATENT HAKKI İZNİ

Beyanlık 25.07.2016
2016-GE-298556

P-40

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

HATA DÜZELTME FORMU

TPE Barkod Alanı
22.07.2016
2016-GE-294290

Patent/Faydalı model başvurusu/belgesi ile ilgili Patent Sicilindeki bilgi hatasının giderilmesi için kullanılması gereken formdur.

Başvuru / Belge No	**2015 10398** Nur Erim
Başvuru / Belge Sahibi Gerçek kişi ise ad ve soyadı, tüzel kişi ise kuruluşun tam ve açık unvanını yazınız.	**Samiye EYUBOĞLU** **EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.**
TC Kimlik / Vergi No Gerçek kişiler için T.C. kimlik no, tüzel kişiler için vergi no ve dairesini giriniz.	HITIT-3840305340
Vekil Adı Soyadı - Sicil No Patent vekili varsa, vekil adı-soyadı/firma unvanı ile vekil sicil numarasını giriniz.	Cinnah Caddesi No:47/3 06690 Çankaya/ANKARA
Açıklama Başvuru/belge ile ilgili düzeltilmesini istediğiniz hatalı bilgiyi (yayındaki bibliyografik bilgi hatası vb.) belirtiniz.	**2015 10398** sayılı **2015-GE-310265** evrak numarasına kayıtlı ve patentin diğer buluş sahipleri bölümünün sehven boş bırakıldığı patent başvuru talebimize ilişkin olarak, aşağıda bilgileri yer alan **Sevgi Güngör**, **Meryem Sedef Erdal** ve **Sinem Güngördük'** ün ilgili patent başvurusuna diğer buluş sahipleri olarak eklenmesini talep ediyoruz. **1.Adı Soyadı:** Sevgi Güngör **T.C.K.No:** 33046085526 **Uyruğu:** TR **Adres:** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul **2.Adı Soyadı:** Meryem Sedef Erdal **T.C.K.No:** 42155124712 **Uyruğu:** TR **Adres:** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul **3.Adı Soyadı:** Sinem Güngördük **T.C.K.No:** 44710258900 **Uyruğu:** TR **Adres:** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul
Talep Başvuru patent vekili aracılığıyla yapılıyorsa bu kısımda vekil imzası bulunmalıdır. Vekil aracılığıyla yapılmıyorsa, başvuru sahibi (tüzel kişi ise) kaşesi ve yetkili bir kişinin	Yukarıda bilgileri verilen başvuru ile ilgili talebimin işleme alınmasını arz ederim.

P-40

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

HATA DÜZELTME FORMU

TPE Barkod Alanı

Patent/Faydalı model başvurusu/belgesi ile ilgili Patent Sicilindeki bilgi hatasının giderilmesi için kullanılması gereken formdur.

Başvuru / Belge No	**2015/10398**
Başvuru / Belge Sahibi Gerçek kişi ise ad ve soyadı, tüzel kişi ise kuruluşun tam ve açık unvanını yazınız.	**Samiye EYUBOĞLU** **EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.**
TC Kimlik / Vergi No Gerçek kişiler için T.C. kimlik no, tüzel kişiler için vergi no ve dairesini giriniz.	HITIT-3840305340
Vekil Adı Soyadı - Sicil No Patent vekili varsa, vekil adı-soyadı/firma unvanı ile vekil sicil numarasını giriniz.	Cinnah Caddesi No:47/3 06690 Çankaya/ANKARA

Açıklama
Başvuru/belge ile ilgili düzeltilmesini istediğiniz hatalı bilgiyi (yayındaki bibliyografik bilgi hatası vb.) belirtiniz.

2015 10398 sayılı **2015-GE-310265** evrak numarasına kayıtlı ve patentin diğer buluş sahipleri bölümünün sehven boş bırakıldığı patent başvuru talebimize ilişkin olarak, aşağıda bilgileri yer alan **Sevgi Güngör**, **Meryem Sedef Erdal** ve **Sinem Güngördük**' ün ilgili patent başvurusuna diğer buluş sahipleri olarak eklenmesini talep ediyoruz.

1.Adı Soyadı : Sevgi Güngör
T.C.K.No : 33046085526
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

2.Adı Soyadı : Meryem Sedef Erdal
T.C.K.No : 42155124712
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

3. Adı Soyadı : Sinem Güngördük
T.C.K.No : 44710258900
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

BULUŞÇU BEYANLARI:

- ☐ Hizmet İlişkisi
- ☐ Devir İntikal
- ☒ **Sözleşme Gereği**
- ☐ Başvuru Sahibi
- ☐ Firma Sahibi/Ortağı

Talep
Başvuru patent vekili aracılığıyla yapılıyorsa bu kısımda vekil imzası bulunmalıdır. Vekil aracılığıyla yapılmıyorsa, başvuru sahibi (tüzel kişi ise) kaşesi ve yetkili bir kişinin imzası, başvuru sahibi (gerçek kişi ise) imzası bulunmalıdır. Başvuru sahibi birden çok ise, her birinin imzası/kaşesi bulunmalıdır

Yukarıda bilgileri verilen başvuru ile ilgili talebimin işleme alınmasını arz ederim.

İmza / Kaşe

EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.

Tarih (gün/ay/yıl)

25/07/2016

Açıklamalar

Hata Düzeltme Formu ve eklerini aşağıdaki adrese gönderiniz:
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ, Patent Dairesi Başkanlığı, Hipodrom Cad. No:115 06330, Yenimahalle - ANKARA

TPE'nin banka hesap numaralarına www.tpe.gov.tr adresinden erişebilirsiniz

Formda yer alan kutucukları işaretleyebilmek için kutucukların üzerine çift tıklamanız gerekmektedir

Beyan dili- 25.07.2016
2016-GE-298531

P-40

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

HATA DÜZELTME FORMU

TPE Barkod Alanı
22.07.2016
2016-GE-296284

Patent/Faydalı model başvurusu/belgesi ile ilgili Patent Sicilindeki bilgi hatasının giderilmesi için kullanılması gereken formdur.

Başvuru / Belge No	**2015 10399** Emre Cihanbeyli
Başvuru / Belge Sahibi Gerçek kişi ise ad ve soyadı, tüzel kişi ise kuruluşun tam ve açık unvanını yazınız.	**Samiye EYUBOĞLU** **EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.**
TC Kimlik / Vergi No Gerçek kişiler için T.C. kimlik no, tüzel kişiler için vergi no ve dairesini giriniz.	HITIT-3840305340
Vekil Adı Soyadı - Sicil No Patent vekili varsa, vekil adı-soyadı/firma unvanı ile vekil sicil numarasını giriniz.	Cinnah Caddesi No:47/3 06690 Çankaya/ANKARA

Açıklama
Başvuru/belge ile ilgili düzeltilmesini istediğiniz hatalı bilgiyi (yayındaki bibliyografik bilgi hatası vb.) belirtiniz.

2015 10399 sayılı **2015-GE-310266** evrak numarasına kayıtlı ve patentin diğer buluş sahipleri bölümünün sehven boş bırakıldığı patent başvuru talebimize ilişkin olarak, aşağıda bilgileri yer alan **Sevgi Güngör**, **Meryem Sedef Erdal** ve **Sinem Güngördük'** ün ilgili patent başvurusuna diğer buluş sahipleri olarak eklenmesini talep ediyoruz.

1.Adı Soyadı: Sevgi Güngör

T.C.K.No: 33046085526

Uyruğu: TR

Adres: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

2.Adı Soyadı: Meryem Sedef Erdal

T.C.K.No: 42155124712

Uyruğu: TR

Adres: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

3.Adı Soyadı: Sinem Güngördük

T.C.K.No: 44710258900

Uyruğu: TR

Adres: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

Talep Başvuru patent vekili aracılığıyla yapılıyorsa bu kısımda vekil imzası bulunmalıdır. Vekil aracılığıyla yapılmıyorsa, başvuru sahibi (tüzel kişi ise) kaşesi ve yetkili bir kişinin	Yukarıda bilgileri verilen başvuru ile ilgili talebimin işleme alınmasını arz ederim.

P-40

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

HATA DÜZELTME FORMU

TPE Barkod Alanı

25.07.2016
2016-GE-

Patent/Faydalı model başvurusu/belgesi ile ilgili Patent Sicilindeki bilgi hatasının giderilmesi için kullanılması gereken formdur.

Başvuru / Belge No

2015 10399

Başvuru / Belge Sahibi
Gerçek kişi ise ad ve soyadı, tüzel kişi ise kuruluşun tam ve açık unvanını yazınız.

Samiye EYUBOĞLU
EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.

TC Kimlik / Vergi No
Gerçek kişiler için T.C. kimlik no, tüzel kişiler için vergi no ve dairesini giriniz.

HITIT-3840305340

Vekil Adı Soyadı - Sicil No
Patent vekili varsa, vekil adı-soyadı/firma unvanı ile vekil sicil numarasını giriniz.

Cinnah Caddesi No:47/3 06690 Çankaya/ANKARA

Açıklama
Başvuru/belge ile ilgili düzeltilmesini istediğiniz hatalı bilgiyi (yayındaki bibliyografik bilgi hatası vb.) belirtiniz.

2015 10399 sayılı **2015-GE-310266** evrak numarasına kayıtlı ve patentin diğer buluş sahipleri bölümünün sehven boş bırakıldığı patent başvuru talebimize ilişkin olarak, aşağıda bilgileri yer alan **Sevgi Güngör**, **Meryem Sedef Erdal** ve **Sinem Güngördük**' ün ilgili patent başvurusuna diğer buluş sahipleri olarak eklenmesini talep ediyoruz.

1.Adı Soyadı : Sevgi Güngör
T.C.K.No : 33046085526
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

2.Adı Soyadı : Meryem Sedef Erdal
T.C.K.No : 42155124712
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

3. Adı Soyadı : Sinem Güngördük
T.C.K.No : 44710258900
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

BULUŞÇU BEYANLARI:

- ☐ Hizmet İlişkisi
- ☐ Devir İntikal
- ☒ **Sözleşme Gereği**
- ☐ Başvuru Sahibi
- ☐ Firma Sahibi/Ortağı

Talep
Başvuru patent vekili aracılığıyla yapılıyorsa bu kısımda vekil imzası bulunmalıdır. Vekil aracılığıyla yapılmıyorsa, başvuru sahibi (tüzel kişi ise) kaşesi ve yetkili bir kişinin imzası, başvuru sahibi (gerçek kişi ise) imzası bulunmalıdır. Başvuru sahibi birden çok ise, her birinin imzası/kaşesi bulunmalıdır

Yukarıda bilgileri verilen başvuru ile ilgili talebimin işleme alınmasını arz ederim.

İmza / Kaşe

EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.

Tarih (gün/ay/yıl)

25/07/2016

Açıklamalar

Hata Düzeltme Formu ve eklerini aşağıdaki adrese gönderiniz:
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ, Patent Dairesi Başkanlığı, Hipodrom Cad. No:115 06330, Yenimahalle - ANKARA

TPE'nin banka hesap numaralarına www.tpe.gov.tr adresinden erişebilirsiniz

Formda yer alan kutucukları işaretleyebilmek için kutucukların üzerine çift tıklamanız gerekmektedir

Beyan dili: 25.07.2016
2016-GE-298523

P-40	TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ HATA DÜZELTME FORMU	TPE Barkod Alanı 22.07.2016 2016-GE-298257

Patent/Faydalı model başvurusu/belgesi ile ilgili Patent Sicilindeki bilgi hatasının giderilmesi için kullanılması gereken formdur.

Başvuru / Belge No	**2015 13223** Besim Apir
Başvuru / Belge Sahibi Gerçek kişi ise ad ve soyadı, tüzel kişi ise kuruluşun tam ve açık unvanını yazınız.	**Samiye EYUBOĞLU** **EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.**
TC Kimlik / Vergi No Gerçek kişiler için T.C. kimlik no, tüzel kişiler için vergi no ve dairesini giriniz.	HITIT-3840305340
Vekil Adı Soyadı - Sicil No Patent vekili varsa, vekil adı-soyadı/firma unvanı ile vekil sicil numarasını giriniz.	Cinnah Caddesi No:47/3 06690 Çankaya/ANKARA
Açıklama Başvuru/belge ile ilgili düzeltilmesini istediğiniz hatalı bilgiyi (yayındaki bibliyografik bilgi hatası vb.) belirtiniz.	**2015 13223** sayılı **2015-GE-387810** evrak numarasına kayıtlı ve patentin diğer buluş sahipleri bölümünün sehven boş bırakıldığı patent başvuru talebimize ilişkin olarak, aşağıda bilgileri yer alan **Sevgi Güngör**, **Meryem Sedef Erdal** ve **Sinem Güngördük**' ün ilgili patent başvurusuna diğer buluş sahipleri olarak eklenmesini talep ediyoruz. **1.Adı Soyadı:** Sevgi Güngör **T.C.K.No:** 33046085526 **Uyruğu:** TR **Adres:** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul **2.Adı Soyadı:** Meryem Sedef Erdal **T.C.K.No:** 42155124712 **Uyruğu:** TR **Adres:** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul **3.Adı Soyadı:** Sinem Güngördük **T.C.K.No:** 44710258900 **Uyruğu:** TR **Adres:** İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul
Talep Başvuru patent vekili aracılığıyla yapılıyorsa bu kısımda vekil imzası bulunmalıdır. Vekil aracılığıyla yapılmıyorsa, başvuru sahibi (tüzel kişi ise) kaşesi ve yetkili bir kişinin	Yukarıda bilgileri verilen başvuru ile ilgili talebimin işleme alınmasını arz ederim.

P-40

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

HATA DÜZELTME FORMU

TPE Barkod Alanı

Patent/Faydalı model başvurusu/belgesi ile ilgili Patent Sicilindeki bilgi hatasının giderilmesi için kullanılması gereken formdur.

Başvuru / Belge No	**2015 13223**
Başvuru / Belge Sahibi Gerçek kişi ise ad ve soyadı, tüzel kişi ise kuruluşun tam ve açık unvanını yazınız.	**Samiye EYUBOĞLU** **EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.**
TC Kimlik / Vergi No Gerçek kişiler için T.C. kimlik no, tüzel kişiler için vergi no ve dairesini giriniz.	HITIT-3840305340
Vekil Adı Soyadı - Sicil No Patent vekili varsa, vekil adı-soyadı/firma unvanı ile vekil sicil numarasını giriniz.	Cinnah Caddesi No:47/3 06690 Çankaya/ANKARA

Açıklama
Başvuru/belge ile ilgili düzeltilmesini istediğiniz hatalı bilgiyi (yayındaki bibliyografik bilgi hatası vb.) belirtiniz.

2015 13223 sayılı **2015-GE-387810** evrak numarasına kayıtlı ve patentin diğer buluş sahipleri bölümünün sehven boş bırakıldığı patent başvuru talebimize ilişkin olarak, aşağıda bilgileri yer alan **Sevgi Güngör, Meryem Sedef Erdal** ve **Sinem Güngördük'** ün ilgili patent başvurusuna diğer buluş sahipleri olarak eklenmesini talep ediyoruz.

1.Adı Soyadı : Sevgi Güngör
T.C.K.No : 33046085526
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

2.Adı Soyadı : Meryem Sedef Erdal
T.C.K.No : 42155124712
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

3. Adı Soyadı : Sinem Güngördük
T.C.K.No : 44710258900
Uyruğu : TR
Adres : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 34116 Beyazıt-İstanbul

BULUŞÇU BEYANLARI:

- ☐ Hizmet İlişkisi
- ☐ Devir İntikal
- ☒ **Sözleşme Gereği**
- ☐ Başvuru Sahibi
- ☐ Firma Sahibi/Ortağı

Talep
Başvuru patent vekili aracılığıyla yapılıyorsa bu kısımda vekil imzası bulunmalıdır. Vekil aracılığıyla yapılmıyorsa, başvuru sahibi (tüzel kişi ise) kaşesi ve yetkili bir kişinin imzası, başvuru sahibi (gerçek kişi ise) imzası bulunmalıdır. Başvuru sahibi birden çok ise, her birinin imzası/kaşesi bulunmalıdır

Yukarıda bilgileri verilen başvuru ile ilgili talebimin işleme alınmasını arz ederim.

İmza / Kaşe

EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.

Tarih (gün/ay/yıl)

25/07/2016

Açıklamalar

Hata Düzeltme Formu ve eklerini aşağıdaki adrese gönderiniz:
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ, Patent Dairesi Başkanlığı, Hipodrom Cad. No:115 06330, Yenimahalle - ANKARA

TPE'nin banka hesap numaralarına www.tpe.gov.tr adresinden erişebilirsiniz

Formda yer alan kutucukları işaretleyebilmek için kutucukların üzerine çift tıklamanız gerekmektedir

2016-GE-294257

21.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT/FAYDALI MODEL BİLGİ/HATA DÜZELTME FORMU

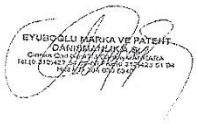
P230

1.BAŞVURU BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/13223
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000395378) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 21.07.2016 15:54:41 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (2) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

İmzası, başvuru sahibi (gerçek kişi ise) imzası bulunmalıdır. Başvuru sahibi birden çok ise, her birinin imzası/kaşesi bulunmalıdır	İmza / Kaşe	Tarih (gün/ay/yıl)
		21/07/2016

Açıklamalar	Hata Düzeltme Formu ve eklerini aşağıdaki adrese gönderiniz: TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ, Patent Dairesi Başkanlığı, Hipodrom Cad. No:115 06330, Yenimahalle - ANKARA
	TPE'nin banka hesap numaralarına www.tpe.gov.tr adresinden erişebilirsiniz
	Formda yer alan kutucukları işaretleyebilmek için kutucukların üzerine çift tıklamanız gerekmektedir

2016-GE-298556

104-P-0155

25.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT EKSİK BELGE/ÜCRET TAMAMLAMA BAŞVURU FORMU

P224

1.TALEP BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/10398
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000261396) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)
Ekler	Diğer,

2.ÖDEME BİLGİSİ

Ödeme Şekli	
Dekont/Ödeme Tarihi	
Dekont/Provizyon Numarası	
Tutar	

3.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC-Vergi Numarası	

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 25.07.2016 16:00:21 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (1) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

2016-GE-307621

29.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT/FAYDALI MODEL DEVİR TALEP FORMU **P206**

1.TALEP BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/10398
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000261396) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Devir Alan Sahip Bilgisi / TC – Vergi Numarası	BİLİM İLAÇ SANAYİ TİCARET A.Ş.
Talep Çeşidi	Tam Devir,
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

2.ÖDEME BİLGİSİ

Ödeme Şekli	Havale
Dekont/Ödeme Tarihi	29.07.2016
Dekont/Provizyon Numarası	f01155
Tutar	500

3.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC-Vergi Numarası	3840305340 EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.

Devir Alan Diğer Sahip Bilgileri

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 29.07.2016 17:24:52 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (2) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

T.C.
Türk Patent Enstitüsü
Patent Dairesi Başkanlığı

Sayı : 39616753- 2015/10398 / E.2016-OE-483582 25.10.2016
Konu : Devir

SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)
CİNNAH CAD. NO:47/3 ÇANKAYA/ANKARA

İlgi: 2016-GE-307621 ve 2016-GE-413670 evrak sayılı dilekçeleriniz.

İlgide kayıtlı dilekçeleriniz üzerine aşağıda numarası verilen dosyada devir işlemi yapılmış olup, 14/10/2016 tarihinde ilgili Sicile kaydedilmiştir.

Saygılarımla.

Göktuğ YAZICI
Enstitü Başkanı a.
Patent Uzman Yardımcısı

DOSYA NUMARASI

2015/10398

EK:

1 - Değişikliği Gösteren Onaylı Tablo

Evrak bilgisine http://www.tpe.gov.tr adresinden "tyzl166D8D86" DYS No ve Evrak tarihinden erişebilirsiniz.
"e-imzalıdır"

Cevaplarda; ilgili yazının çıktığı daire, tarih ve sayının tam olarak yazılması rica olunur.

Hipodrom Caddesi No: 115 Yenimahalle 06330 ANKARA - Telefon: (0 312) 303 10 00 Fax :(0 312) 303 11 30
e-posta: bilgiedinme@tpe.gov.tr - Elektronik Ağ: www.tpe.gov.tr

TURK PATENT ENSTITUSU

DEĞİŞİKLİĞİ GÖSTEREN TABLO

2015/10398			
İŞLEM TÜRÜ	ESKİ	YENİ	SİCİLE KAYIT TARİHİ
Devir	BÜLENT KARAAĞAÇ Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İstanbul	BİLİM İLAÇ SANAYİ TİCARET A.Ş. Kaptanpaşa Mahallesi Zincirlikuyu Caddesi No:184 34440 Beyoğlu İstanbul	2016/10/14

T.C. PATENT DAİRESİ BAŞKANLIĞI TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ 1923

2015/10398 2015-GE-310265

21.08.2015

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ **PATENT BAŞVURU FORMU** **P201**

1. BAŞVURU BİLGİSİ

Başvuru Şekli/Ana Başvuru Numarası	Yeni Başvuru
Erken Yayın Talebi	Yok
Buluş Başlığı	TOPİKAL FORMÜLASYONLAR
Türkçe Çeviri Süre Talebi	Yok
Referans No	104-P-0155
Patent Sınıfı	
Tarifname Dili	TUR
Tarifname	11 Sayfa
İstem	18 Adet
Özet	1 Sayfa
Resim	null Sayfa

2. BAŞVURU SAHİBİ

Adı-Soyadı/Unvanı	BÜLENT KARAAĞAÇ		
Adres	Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR		
Uyruğu	TR	**Sahip Türü**	Gerçek
TC Kimlik/Vergi Numarası	41050713922	**Sahip Profili**	

3. BULUŞ SAHİBİ

Adı-Soyadı	BÜLENT KARAAĞAÇ		
Adres	Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler TR		
TC Kimlik Numarası	41050713922	**Sahip Profili**	
Uyruğu	TR	**Beyan**	Başvuru Sahibi

4. RÜÇHAN BİLGİLERİ

Rüçhan Çeşidi	Ülke	Sergi Adı / Başvuru Numarası	Tarih

5. PATENT VEKİLİ

Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

6.ÖDEME BİLGİSİ

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 21.08.2015 19:30:32 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (4) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

Ödeme Şekli	Havale
Dekont/Ödeme Tarihi	21.08.2015
Dekont/Provizyon Numarası	F00658
Tutar	40.0

7.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC - Vergi Numarası	3840305340 EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.

8.DİĞER BAŞVURU SAHİPLERİ

(Başvuru Sahibinin Birden Fazla Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

9. DİĞER BULUŞ SAHİPLERİ

(Birden Fazla Buluş Sahibi Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

10. DİĞER RÜÇHAN BİLGİLERİ

(Birden Fazla Rüçhan Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

2016-GE-294284

21.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT/FAYDALI MODEL BİLGİ/HATA DÜZELTME FORMU — **P230**

I.BAŞVURU BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/10399
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000261396) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance I Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 21.07.2016 16:03:20 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (2) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

imzası, başvuru sahibi (gerçek kişi ise) imzası bulunmalıdır. Başvuru sahibi birden çok ise, her birinin imzası/kaşesi bulunmalıdır	İmza / Kaşe	Tarih (gün/ay/yıl)
	EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DANIŞMANLIK A.Ş.	21/07/2016

Açıklamalar	Hata Düzeltme Formu ve eklerini aşağıdaki adrese gönderiniz: TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ, Patent Dairesi Başkanlığı, Hipodrom Cad. No:115 06330, Yenimahalle - ANKARA
	TPE'nin banka hesap numaralarına www.tpe.gov.tr adresinden erişebilirsiniz
	Formda yer alan kutucukları işaretleyebilmek için kutucukların üzerine çift tıklamanız gerekmektedir

2016-GE-298531
104-P-0156

25.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT EKSİK BELGE/ÜCRET TAMAMLAMA BAŞVURU FORMU

P224

1.TALEP BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/10399
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000261396) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)
Ekler	Diğer.

2.ÖDEME BİLGİSİ

Ödeme Şekli	
Dekont/Ödeme Tarihi	
Dekont/Provizyon Numarası	
Tutar	

3.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC-Vergi Numarası	

Buluşun başlığı eklendi

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 25.07.2016 15:54:44 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (1) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

2016-GE-307648

29.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT/FAYDALI MODEL DEVİR TALEP FORMU **P206**

1.TALEP BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/10399
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000261396) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Devir Alan Sahip Bilgisi / TC – Vergi Numarası	BİLİM İLAÇ SANAYİ TİCARET A.Ş.
Talep Çeşidi	Tam Devir.
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

2.ÖDEME BİLGİSİ

Ödeme Şekli	Havale
Dekont/Ödeme Tarihi	29.07.2016
Dekont/Provizyon Numarası	F01148
Tutar	500

3.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC-Vergi Numarası	3840305340 EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.

Devir Alan Diğer Sahip Bilgileri

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 29.07.2016 17:28:39 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (2) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

T.C.
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ
Patent Dairesi Başkanlığı

Sayı : 39616753/ E.2016-OE-517899 16.11.2016
Konu : Devir

SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)
CİNNAH CAD. NO:47/3 ÇANKAYA/

İlgi: 2016-GE-307648 evrak sayılı dilekçeniz.

İlgide kayıtlı dilekçeniz üzerine aşağıda numarası verilen dosyada devir işlemi yapılmış olup, 29/07/2016 tarihinde ilgili Sicile kaydedilmiştir.

Saygılarımla.

Gökçe KUZGUN
Enstitü Başkanı a.
Patent Uzman Yardımcısı

DOSYA NUMARASI

2015/10399

EK:

Değişikliği Gösteren Onaylı Tablo

Evrak bilgisine http://www.tpe.gov.tr adresinden "hsrg172429ED" DYS No ve Evrak tarihinden erişebilirsiniz.
"e-imzalıdır"
Cevaplarda; ilgili yazının çıktığı daire, tarih ve sayının tam olarak yazılması rica olunur.

Hipodrom Caddesi No: 115 Yenimahalle 06330 ANKARA - Telefon: (0 312) 303 10 00 Fax :(0 312) 303 11 30
e-posta: bilgiedinme@tpe.gov.tr - Elektronik Ağ: www.tpe.gov.tr

06 ARALIK 2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

DEĞİŞİKLİĞİ GÖSTEREN TABLO

2015/10399			
İŞLEM TÜRÜ	ESKİ	YENİ	SİCİLE KAYIT TARİHİ
Devir	BÜLENT KARAAĞAÇ Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İstanbul	BİLİM İLAÇ SANAYİ VE TİCARET ANONİM ŞİRKETİ Kaptanpaşa Mahallesi, Zincirlikuyu Caddesi, No:184 Beyoğlu İstanbul	2016/07/29

T.C. TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ 1923 PATENT DAİRESİ BAŞKANLIĞI

2015/10399 2015-GE-310266

21.08.2015

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ **PATENT BAŞVURU FORMU** **P201**

1. BAŞVURU BİLGİSİ

Başvuru Şekli/Ana Başvuru Numarası	Yeni Başvuru
Erken Yayın Talebi	Yok
Buluş Başlığı	TOPİKAL FORMÜLASYONLAR
Türkçe Çeviri Süre Talebi	Yok
Referans No	104-P-0156
Patent Sınıfı	
Tarifname Dili	TUR
Tarifname	11 Sayfa
İstem	24 Adet
Özet	1 Sayfa
Resim	null Sayfa

2. BAŞVURU SAHİBİ

Adı-Soyadı/Unvanı	BÜLENT KARAAĞAÇ		
Adres	Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR		
Uyruğu	TR	**Sahip Türü**	Gerçek
TC Kimlik/Vergi Numarası	41050713922	**Sahip Profili**	

3. BULUŞ SAHİBİ

Adı-Soyadı	BÜLENT KARAAĞAÇ		
Adres	Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler TR		
TC Kimlik Numarası	41050713922	**Sahip Profili**	
Uyruğu	TR	**Beyan**	Başvuru Sahibi

4. RÜÇHAN BİLGİLERİ

Rüçhan Çeşidi	Ülke	Sergi Adı / Başvuru Numarası	Tarih

5. PATENT VEKİLİ

Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

6.ÖDEME BİLGİSİ

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 21.08.2015 19:41:10 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (4) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

Ödeme Şekli	Havale
Dekont/Ödeme Tarihi	21.08.2015
Dekont/Provizyon Numarası	F00657
Tutar	40.0

7.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC - Vergi Numarası	3840305340 EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.

8.DİĞER BAŞVURU SAHİPLERİ

(Başvuru Sahibinin Birden Fazla Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

9. DİĞER BULUŞ SAHİPLERİ

(Birden Fazla Buluş Sahibi Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

10. DİĞER RÜÇHAN BİLGİLERİ

(Birden Fazla Rüçhan Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

2016-GE-294257

21.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT/FAYDALI MODEL BİLGİ/HATA DÜZELTME FORMU

P230

1.BAŞVURU BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/13223
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000395378) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 21.07.2016 15:54:41 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (2) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

İmzası, başvuru sahibi (gerçek kişi ise) imzası bulunmalıdır. Başvuru sahibi birden çok ise, her birinin imzası/kaşesi bulunmalıdır	İmza / Kaşe	Tarih (gün/ay/yıl)
		**21/07/2016**

Açıklamalar	Hata Düzeltme Formu ve eklerini aşağıdaki adrese gönderiniz: TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ, Patent Dairesi Başkanlığı, Hipodrom Cad. No:115 06330, Yenimahalle - ANKARA
	TPE'nin banka hesap numaralarına www.tpe.gov.tr adresinden erişebilirsiniz
	Formda yer alan kutucukları işaretleyebilmek için kutucukların üzerine çift tıklamanız gerekmektedir

2016-GE-307759

29.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT/FAYDALI MODEL DEVİR TALEP FORMU **P206**

1.TALEP BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/13223
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000395378) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Devir Alan Sahip Bilgisi / TC – Vergi Numarası	BİLİM İLAÇ SANAYİ TİCARET A.Ş.
Talep Çeşidi	Tam Devir,
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

2.ÖDEME BİLGİSİ

Ödeme Şekli	Havale
Dekont/Ödeme Tarihi	29.07.2016
Dekont/Provizyon Numarası	f01159
Tutar	500

3.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC-Vergi Numarası	3840305340 EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.

Devir Alan Diğer Sahip Bilgileri

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 29.07.2016 17:50:12 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (2) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

T.C.
TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ
Patent Dairesi Başkanlığı

Sayı : 39616753/ E.2016-OE-481725 24.10.2016
Konu : Devir

SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)
CİNNAH CAD. NO:47/3 ÇANKAYA/ ANKARA

İlgi: a) 2016-GE-307759 ve
b) 2016-GE-413875 evrak sayılı dilekçeleriniz.

İlgide kayıtlı dilekçeleriniz üzerine aşağıda numarası verilen dosyada devir işlemi yapılmış olup, 14/10/2016 tarihinde ilgili Sicile kaydedilmiştir.

Saygılarımla.

Hakan KONCA
Enstitü Başkanı a.
Patent Uzman Yardımcısı

DOSYA NUMARALARI

2015/13223

EK:

1 - Değişikliği Gösteren Onaylı Tablo

Evrak bilgisine http://www.tpe.gov.tr adresinden "qoqg1663C7C7" DYS No ve Evrak tarihinden erişebilirsiniz.
"e-imzalıdır"
Cevaplarda; ilgili yazının çıktığı daire, tarih ve sayının tam olarak yazılması rica olunur.

Hipodrom Caddesi No: 115 Yenimahalle 06330 ANKARA - Telefon: (0 312) 303 10 00 Fax :(0 312) 303 11 30
e-posta: - Elektronik Ağ:

27 EKİM 2016

PATENT

DEĞİŞİKLİĞİ GÖSTEREN TABLO

2015/13223			
İŞLEM TÜRÜ	ESKİ	YENİ	SİCİLE KAYIT TARİHİ
Devir	BÜLENT KARAAĞAÇ Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İstanbul	BİLİM İLAÇ SANAYİ TİCARET A.Ş. Kaptanpaşa Mahallesi Zincirlikuyu Caddesi No:184 34440 Beyoğlu İstanbul	2016/10/14

T.C. TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ PATENT DAİRESİ BAŞKANLIĞI

2015/13223 2015-GE-387810

22.10.2015

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ **PATENT BAŞVURU FORMU** **P201**

1. BAŞVURU BİLGİSİ

Başvuru Şekli/Ana Başvuru Numarası	Yeni Başvuru
Erken Yayın Talebi	Yok
Buluş Başlığı	TOPİKAL FORMÜLASYONLAR
Türkçe Çeviri Süre Talebi	Yok
Referans No	104-P-0166
Patent Sınıfı	
Tarifname Dili	TUR
Tarifname	11 Sayfa
İstem	22 Adet
Özet	1 Sayfa
Resim	null Sayfa

2. BAŞVURU SAHİBİ

Adı-Soyadı/Unvanı	BÜLENT KARAAĞAÇ		
Adres	Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR		
Uyruğu	TR	**Sahip Türü**	Gerçek
TC Kimlik/Vergi Numarası	41050713922	**Sahip Profili**	

3. BULUŞ SAHİBİ

Adı-Soyadı	BÜLENT KARAAĞAÇ		
Adres	Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Maya Residance 1 Blok D.3 Etiler TR		
TC Kimlik Numarası	41050713922	**Sahip Profili**	
Uyruğu	TR	**Beyan**	Başvuru Sahibi

4. RÜÇHAN BİLGİLERİ

Rüçhan Çeşidi	Ülke	Sergi Adı / Başvuru Numarası	Tarih

5. PATENT VEKİLİ

Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)

6.ÖDEME BİLGİSİ

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 22.10.2015 16:25:35 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (4) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

Ödeme Şekli	Havale
Dekont/Ödeme Tarihi	22.10.2015
Dekont/Provizyon Numarası	F00258
Tutar	40.0

7.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC - Vergi Numarası	3840305340 EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.

8.DİĞER BAŞVURU SAHİPLERİ

(Başvuru Sahibinin Birden Fazla Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

9. DİĞER BULUŞ SAHİPLERİ

(Birden Fazla Buluş Sahibi Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

10. DİĞER RÜÇHAN BİLGİLERİ

(Birden Fazla Rüçhan Olması Durumunda Bilgiler Bu Alanda Yer Alacaktır)

2016-GE-298523

104-P-0166

25.07.2016

TÜRK PATENT ENSTİTÜSÜ

PATENT EKSİK BELGE/ÜCRET TAMAMLAMA BAŞVURU FORMU P224

1.TALEP BİLGİSİ

"Ekte sunulan belgelerin aslına uygun olduğunu kabul ve beyan ederim."

Başvuru/Belge Numarası	2015/13223
Başvuru Sahibi/TC-Vergi Numarası	1) (2000395378) T.C NO(41050713922) BÜLENT KARAAĞAÇ / Otlukbeli Cad. Arnavutköy Yol Sk. No:5 Mayn Residance 1 Blok D.3 Etiler İSTANBUL TR
Vekil Bilgisi	P(922) M(1376) SAMİYE EYUBOĞLU (EYUBOĞLU MARKA VE PATENT DAN. A.Ş.)
Ekler	Diğer.

2.ÖDEME BİLGİSİ

Ödeme Şekli	
Dekont/Ödeme Tarihi	
Dekont/Provizyon Numarası	
Tutar	

3.FATURA BİLGİSİ

Fatura Kesilecek TC-Vergi Numarası	

Bulusan beyan eklendi

***Talep SAMİYE EYUBOĞLU tarafından 25.07.2016 15:52:53 tarihinde elekronik olarak imzalanarak TPE kayıtlarına alınmıştır.
***Evrak ve (1) adet eki orjinalinin aynısıdır ve imza geçerlilik kontrolünden başarıyla geçmiştir.(TPE Bilgi İşlem)

TELİF HAKKI İZNİ